

ALEXANDRE STE-MARIE

LES EFFETS DU PEPTIDE MTPG-43 SUR LES CELLULES MÉGACARYOCYTAIRES HUMAINES

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biochimie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

© Alexandre Ste-Marie, 2008

Résumé

La mégacaryopoïèse est le nom donné à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) en mégacaryocytes (MCs). Elles sont les cellules spécialisées précurseurs des plaquettes sanguines. Au cours de leur maturation, les MCs entreprennent plusieurs rondes successives de réplication d'ADN. Ce phénomène est appelé endomitose. De récentes évidences suggèrent que les MCs endomitotiques seraient incapables de compléter leur division cellulaire. Dans le cadre de ce projet de recherche, il a été démontré que la surproduction du peptide MTPG-43 dans des lignées leucémiques humaines entraîne une augmentation du volume cytoplasmique et un changement de morphologie cellulaire, rappelant ainsi certaines acquisitions du MC différencié. Fusionné ou non à des marqueurs fluorescents, la surexpression transgénique du peptide dans les lignées exprimant un phénotype mégacaryocytaire entraîne un accroissement de la taille des cellules sans pour autant faire intervenir une augmentation du degré de ploïdie nucléaire. N'affectant pas la viabilité, l'accumulation du peptide à la membrane cytoplasmique semble rendre les cellules plus labiles. L'expression du peptide dans des MCs dérivés de cultures de CSHs de sang de cordon à l'aide d'un vecteur d'expression adénoviral n'a cependant pas permis d'accroître la production de plaquettes *in vitro*. Ce peptide demeure toutefois un outil moléculaire intéressant pour approfondir et élucider les mécanismes biologiques qui provoquent le gigantisme cellulaire.

Avant-Propos

Je termine finalement mes études à l'Université Laval. Mon aventure m'a conduit dans les laboratoires d'Héma-Québec où ma curiosité et mon désir d'apprendre ont été sollicités. Je n'aurais pu choisir meilleur endroit pour poursuivre mes études graduées.

Je tiens à remercier personnellement le Dr Serge Côté et Carl Simard pour leur dévouement exemplaire. Ils ont eu à cœur ma réussite tout au long de mes deux années passées en leur compagnie. Je tiens également à souligner la précieuse contribution du comité aviseur attribué à mon projet: Dr Nicolas Pineault, Dr Daniel Jung, Dr André Darveau et Dr Serge Côté. Vos commentaires et vos idées m'ont permis d'élever à un degré supérieur ma formation scientifique.

À toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'avancement de mon projet de recherche, je vous en suis reconnaissant. Je salue particulièrement Marc-André Roy et Jean-François Lauzon, deux stagiaires doués pour la recherche qui m'ont fait gagner du temps précieux.

Je ne peux passer sous silence l'excellente compagnie des étudiants gradués avec qui j'ai entretenu de belles relations. Bon succès à vous mes amis. Vous méritez, de part votre travail acharné, la reconnaissance et l'admiration. À tous les travailleurs d'Héma-Québec que j'ai eu le plaisir de côtoyer, vous avez été et vous continuerez d'être à mes yeux des modèles à suivre.

Une pensée spéciale aux 5 frères du Châteaufort qui m'ont accompagné lors de mes études universitaires.

Finalement, selon mon grand oncle Philippe Laurin, un sage parmi les plus sages, « L'eau qui coule n'oublie jamais sa source ». Je vais prendre le temps de retourner auprès de ma famille. Ensuite, je poursuivrai mon chemin.

Table des matières

Résumé.....	i
Avant-Propos.....	ii
Tables des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
1 Introduction.....	1
1.1 Héma-Québec et ses services logistiques.....	1
1.2 Le tissu sanguin.....	2
1.2.1 L'hématopoïèse.....	3
1.2.2 Les cellules souches hématopoïétiques.....	5
1.2.2.1 L'identification des CSHs.....	5
1.2.3 La moelle osseuse : site exclusif de l'hématopoïèse.....	6
1.3 La mégacaryopoïèse.....	7
1.3.1 La thrombopoïèse.....	9
1.3.2 Les marqueurs membranaires qui caractérisent la différenciation mégacaryocytaire.....	10
1.3.3 Le facteur biochimique indispensable à la mégacaryopoïèse : la TPO	12
1.3.3.1 Le récepteur de la TPO : c-Mpl.....	12
1.3.4 Les facteurs de transcription nucléaire entraînant la différenciation mégacaryocytaire.....	14
1.4 Les plaquettes : leurs caractéristiques structurales et leurs fonctions biologiques	15
1.5 Le gigantisme mégacaryocytaire.....	17
1.5.1 L'augmentation de la taille du MC est dépendante de trois phases	17
1.6 Un des éléments fondamentaux de la maturation du MC est l'endomitose.....	18

1.6.1 Les principes de bases de la polyploïdisation ou hyperploïdisation	19
1.6.2 L'endomitose est le résultat d'un cycle cellulaire unique aux MCs	19
1.6.3 Le cytosquelette du MC subit une réorganisation structurale majeure lors de l'endomitose.	21
1.6.4 Les molécules utilisées en laboratoire pour induire l'hyperploïdisation dans les lignées cellulaires.	22
1.6.5 Les molécules utilisées en laboratoire pour induire l'hyperploïdisation dans les CSHs.	22
1.7 La problématique entourant l'utilisation de CSHs de sang de cordon ombilical pour produire des plaquettes <i>in vitro</i> .	23
1.8 L'étude de la cytocinèse apporte des informations structurales supplémentaires en ce qui concerne l'endomitose.	25
1.8.1 Les radeaux lipidiques de PI(4,5)P ₂ s'accumulent au sillon de clivage et sont nécessaires pour compléter la cytocinèse.	26
1.8.2 L'étude de la polyploïdisation par les radeaux lipidiques de PI(4,5)P ₂	26
1.8.3 La portion N-terminale de GAP-43 : un outil moléculaire potentiel pour l'étude du sillon de clivage.	27
1.9 Les objectifs du projet de maîtrise.	29
2 Matériel et méthodes.	31
2.1 Les lignées cellulaires et leurs conditions de culture.	31
2.2 Les digestions avec les enzymes de restrictions.	32
2.3 Ligation à l'aide de la ligase du phage T4.	32
2.4 Précipitation à l'éthanol des vecteurs plasmidiques.	32
2.5 Électrophorèse, extraction sur gel d'agarose et purification des acides nucléiques avec la trousse QIAGEN.	33
2.6 Utilisation de bactéries chimiocompétentes DH5α.	34
2.7 Mini-préparations d'ADN plasmidique.	34

3.1 L'expression exogène de la protéine membranaire MTPG-43-EYFP dans un modèle d'étude apprenné aux MCs provoque un phénotype de gigantisme cellulaire.....	48
3.2 Identification de l'élément responsable du gigantisme cellulaire provoqué par la protéine chimérique MTPG-43-EYFP.....	50
3.3 Construction des plasmides exprimant les protéines chimériques.....	53
3.4 Le promoteur MT663 et la lignée cellulaire K562 ont été désignés pour poursuivre l'étude sur le phénotype de gigantisme cellulaire.....	55
3.4.1 L'inductibilité du promoteur MT663 dans les cellules K562 transformées est négligeable.....	56
3.5 Détection des protéines chimériques.....	57
3.6 Localisation intracellulaire du peptide MTPG-43.....	61
3.6.1 Le peptide MTPG-43 s'accumule de façon irrégulière à la membrane cytoplasmique.....	61
3.6.2 L'accumulation du peptide MTPG-43 dans les clones de cellules K562 semble être localisée au même endroit que le plan de clivage formé lors de la division cellulaire.....	62
3.6.3 Le peptide MTPG-43 s'accumule également en forte concentration au sein de l'appareil de Golgi.....	64
3.7 Les cellules K562 exprimant le peptide MTPG-43 augmentent de taille mais n'affichent pas le gigantisme cellulaire observé chez les cellules M07e.....	65
3.8 Le phénomène de polyploïdisation est dissocié du phénotype de gigantisme cellulaire.....	68
3.9 La production exogène de protéines chimériques n'affecte pas la prolifération cellulaire des cellules K562 transformées.....	70
3.10 Modifications chimiques du peptide MTPG-43.....	72
3.11 La mutagenèse dirigée indique que l'acylation du peptide MTPG-43 est essentielle pour le diriger à la membrane cytoplasmique.....	75
3.12 Infections des CSHs provenant de sang de cordon ombilical à l'aide d'un vecteur adénoviral.....	80
4 Discussion.....	84

5 Conclusion.....	92
6 Bibliographie.....	93

Liste des tableaux

Tableau 1: Paramètres physico-chimiques du peptide MTPG-43.....	28
Tableau 2: Illustrations des différentes versions de protéines chimériques testées.....	51
Tableau 3: Caractéristiques des versions de protéines chimériques testées.....	53
Tableau 4 : Les mutations apportées au peptide MTPG-43 et leurs impacts sur la modification post-traductionnelle.....	76
Tableau 5 : Détection du peptide MTPG-43 selon les modifications engendrées par la mutagenèse dirigée.....	77
Tableau 6 : Infection par des adénovirus recombinants sur des CSHs provenant de sang de cordon ombilical.....	81
Tableau 7 : Nombre de plaquettes produites par CSHsensemencées et infectées par des adénovirus recombinants selon la dose infectieuse.....	83

Liste des figures

Figure 1.2 : Les cellules du sang: leur durée de vie et leurs fonctions biologiques.....	2
Figure 1.2.1: Le modèle général de l'hématopoïèse.....	4
Figure 1.2.3: Représentation de la moelle osseuse rouge, site <i>in vivo</i> de l'hématopoïèse.....	6
Figure 1.3: La voie de différenciation mégacaryocytaire.....	8
Figure 1.3.1: La libération des plaquettes lors de la thrombopoïèse.....	10
Figure 1.3.3.1: La signalisation intracellulaire engendrée par la liaison de la TPO avec son récepteur c-Mpl.....	13
Figure 1.4: L'agrégation plaquettaire au site d'une lésion vasculaire.....	16
Figure 1.5.1 Les trois phases de l'amplification de la masse mégacaryocytaire.....	18
Figure 1.6.2 : L'endomitose est imputable à une mitose inachevée.....	20
Figure 1.7.1 Les CBs ont une faible propension à devenir polyploïde comparativement à leurs homologues issus du sang périphérique.....	24
Figure 1.7.2 La production plaquettaire des CBs et des PBs au terme de leur maturation <i>in vitro</i>	25
Figure 1.8: Les étapes de la cytokinèse.....	26
Figure 1.8.3 : Le peptide MTPG-43.....	28
Figure 3.1 : Les cellules mégacaryocytaires M07e qui expriment la protéine membranaire MTPG-43-EYFP affichent un phénotype de gigantisme cellulaire.....	50
Figure 3.3 : Des réactions PCR ont généré les amplicons MTPG-43-½ EYFP et MTPG-43.....	54
Figure 3.4.1 Une expression constitutive de base des transgènes est détectée en absence d'induction.....	56
Figure 3.5.1 : Les protéines chimériques fluorescentes sont détectées aux membranes cytoplasmiques et dans un autre compartiment cellulaire.....	57
Figure 3.5.2. Les protéines non fluorescentes possèdent les poids moléculaires attendus tel que révélé par immuno-empreinte.....	58
Figure 3.5.3: Le peptide MTPG-43 s'accumule de façon irrégulière à la membrane cytoplasmique.....	60

Figure 3.6.1 : La membrane cytoplasmique du clone K562-MT663-MTPG-43 est tapissée irrégulièrement par le peptide MTPG-43.....	62
Figure 3.6.2 : Le peptide MTPG-43 et le réseau de filaments d'actine sont présents de façon abondantes au plan de clivage dans les cellules du clone K562-MT663-MTPG-43 au terme de la division cellulaire.....	63
Figure 3.6.3 : La protéine MTPG-43-EYFP est également localisée à l'appareil de Golgi dans les cellules du clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP.....	64
Figure 3.7.1 : Les clones de cellules K562 augmentent en taille suite à l'expression du peptide MTPG-43.....	66
Figure 3.7.2 : Le peptide MTPG-43 est l'agent responsable de l'augmentation de la taille cellulaire.....	67
Figure 3.8 : La coloration à l'iodure de propidium (IP) des clones n'a pas mis en évidence le phénomène d'hyperploïdisation nucléaire.....	69
Figure 3.9 Le taux d'expansion des clones en culture est comparable aux cellules contrôles.....	71
Figure 3.10.1. : Le 2-bromo-palmitate et la brefeldine A ont déstabilisé l'ancrage de la protéine MTPG-43-EYFP à la membrane et son agglomération à l'appareil de Golgi.....	73
Figure 3.10.2 : Le SU6656 favorise l'hyperploïdie du clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP	74
Figure 3.10.3 : Le SU6656 favorise la dispersion de l'appareil de Golgi et par conséquent du peptide MTPG-43 chez le clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP.....	75
Figure 3.11 : Certaines versions du peptide muté provoquent des ramifications cellulaires dans les lignées HEK 293 et COS-7.....	79

Liste de abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
BFU-MK	Burst Forming Unit-Megakaryocyte
CBS	Cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon ombilical
CD	Cluster of differentiation
CFU-MK	Colony Forming Unit-Megakaryocyte
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CFU-MK	Colony Forming Unit-Megakaryocyte)
EPO	Érythropoïétine
FBS	Sérum foetal bovin
GAP-43	Growth-Associated Protein of 43 kDa
GP	Glycoprotéine
HPP-CFU-Mk	(high proliferative potential colony-forming cells-megakaryocyte
IL	Interleukine
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Media
IP	Iodure de propidium
MC	Mégacaryocyte
MIM	Mégacaryocyte immature
MTPG-43	Membrane-Targeting-Peptide of GAP-43
PB	Cellules souches hématopoïétiques issues du sang périphérique
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Réaction de polymerisation en chaîne
PI(4,5)P ₂	Phosphatidyl inositol 4,5 biphosphates
PMKB	Promégacaryoblaste
PVDF	Polyvinylidene difluoride
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TPO	Thrombopoïétine

1 Introduction

1.1 Héma-Québec et ses services logistiques

Héma-Québec est l'unique banque de sang au Québec qui est mandatée et reconnue pour garantir l'accès à la population à des produits sanguins de qualité. Le tremplin de toutes les logistiques assurant l'approvisionnement des hôpitaux de la province est sous son entière responsabilité. Dans son but premier d'améliorer constamment ses services, cet organisme met l'accent, notamment, sur la recherche et le développement de technologies novatrices.

Un des projets en cours de réalisation a pour objectif la production *in vitro* de plaquettes en bioréacteur. L'accomplissement de cette tâche est basé sur l'exploitation des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) provenant de sang de cordon ombilical. Riche en plusieurs sous-ensembles de cellules souches dont les CSHs, ce sang est relativement facile à obtenir et la pérennité de la ressource est quasi absolue. Elles sont stimulées plus rapidement et efficacement par les facteurs de croissance que leurs homologues cellulaires retrouvés *in vivo* et elles possèdent aussi un potentiel réplicatif supérieur[1]. Bref, il existe plusieurs avantages significatifs et revendications éthiques qui justifient l'utilisation de ce type de cellules souches à des fins médicales et industrielles[2,3].

La pertinence de concrétiser ce programme de recherche ne repose pas principalement sur l'accessibilité de la matière première (sang de cordon) mais surtout sur les problèmes opérationnels engendrés par la collecte et l'entreposage des concentrés plaquettaires destinés à la collectivité. En effet, les concentrés plaquettaires proviennent d'un groupe aléatoire de donneurs ce qui augmente les risques d'incompatibilités pour les receveurs[4-6]. De plus, la température de conservation est fixée à 20-24°C, ce qui limite à 5 jours seulement la période optimale de préservation[7,8].

La capacité de fournir sur demande des plaquettes sanguines sécuritaires aux hôpitaux optimiserait l'efficacité d'Héma-Québec en matière de contrôle et de distribution de ses produits. La réussite prochaine du projet repose sur des connaissances bien établies

dans les domaines tels que la biochimie, l'ingénierie cellulaire et la médecine transfusionnelle.

1.2 Le tissu sanguin

Le sang joue plusieurs rôles essentiels dans le maintien de la viabilité. Il est la pierre angulaire de la respiration, du transport des nutriments et des hormones, de la régulation des différentes constantes physiologiques et de la défense immunitaire. En parcourant les milliers de vaisseaux sanguins qui composent l'organisme, le sang assure ainsi le contrôle de l'homéostasie, état d'équilibre retrouvé chez tous les êtres vivants. Ce tissu mésenchymateux contient une phase cellulaire constituée d'« éléments figurés » nommés globules rouges, globules blancs et plaquettes [9]. Tous ces éléments sont transportés via la circulation sanguine ce qui les rend disponibles aux endroits où ils sont requis.

CELLULE		DURÉE DE VIE DANS LE SANG	FONCTION
ÉRYTHROCYTE		120 JOURS	VÉHICULE DE L'OXYGÈNE
MONOCYTE		3 JOURS	DÉFENSE DE L'ORGANISME SURVEILLANCE IMMUNITAIRE. (PRÉCURSEUR DES MACROPHAGES)
NEUTROPHILE		7 HEURES	DÉFENSE DE L'ORGANISME
ÉOSINOPHILE		?	DÉFENSE DE L'ORGANISME CONTRE LES PARASITES ET LES ALLERGIES
BASOPHILE		?	INFLAMMATION ET ALLERGIE
PLAQUETTES		7-8 JOURS	COAGULATION DU SANG
LYMPHOCYTE T		?	IMMUNITÉ CELLULAIRE
LYMPHOCYTE B		?	ANTICORPS (PRÉCURSEUR DES PLASMOCYTES)

Figure 1.2 Les cellules du sang: leur durée de vie et leurs fonctions biologiques[10]

Toutefois, tous ces éléments biologiques et cellulaires sont appelés à être utilisés ou remplacés périodiquement. Il existe chez les mammifères un système de production continu de cellules sanguines qui est responsable à lui seul de combler le manque d'effectifs de tous les sous-ensembles cellulaires. Par exemple, 200 milliards d'érythrocytes, 100 milliards de leucocytes et 100 milliards de plaquettes sont fabriqués chaque jour en moyenne chez un individu adulte en santé. Ces valeurs peuvent augmenter d'un facteur de 10 et plus encore selon la demande[11].

1.2.1 L'Hématopoïèse

Le processus naturel et continu qui assure la production quantitativement importante des multiples populations cellulaires qui composent le sang se nomme hématopoïèse. Le modèle jusqu'à maintenant accepté pour illustrer le phénomène est de type hiérarchique où chaque ramification de l'organigramme correspond à une cellule un peu plus différenciée de la cellule souche. La première étape de l'hématopoïèse consiste à former des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes. En effet, le programme génétique de différenciation cellulaire diffère largement entre la lignée lymphoïdes (cellule NK, lymphocyte B et T) et la lignée myéloïdes (granulocyte, monocyte, érythrocyte et plaquette) ce qui explique la présence de progéniteurs « primitifs » distincts. Les phases ultérieures assurent une spécialisation toujours un peu plus poussée des progéniteurs jusqu'à l'obtention de la cellule mature désirée [11-13].

Peu importe la finalité de la différenciation cellulaire de la CSH, l'apport constant de signaux endogènes et exogènes est indispensable pour mener à terme tous les programmes de différenciation potentiellement réalisables lors de l'hématopoïèse. La survie, la prolifération et la différenciation cellulaire sont contrôlées par des facteurs de croissance et des cytokines. Ils sont requis à tous les stades de maturation. Les cytokines sont liées intrinsèquement à la différenciation parce qu'elles activent, via leurs liaisons avec des récepteurs exprimés à la surface des membranes cytoplasmique, des sentiers métaboliques spécifiques à chaque lignée cellulaire. Bref, l'hématopoïèse est hautement régulée par plusieurs « messagers chimiques »[11,14,15,17].

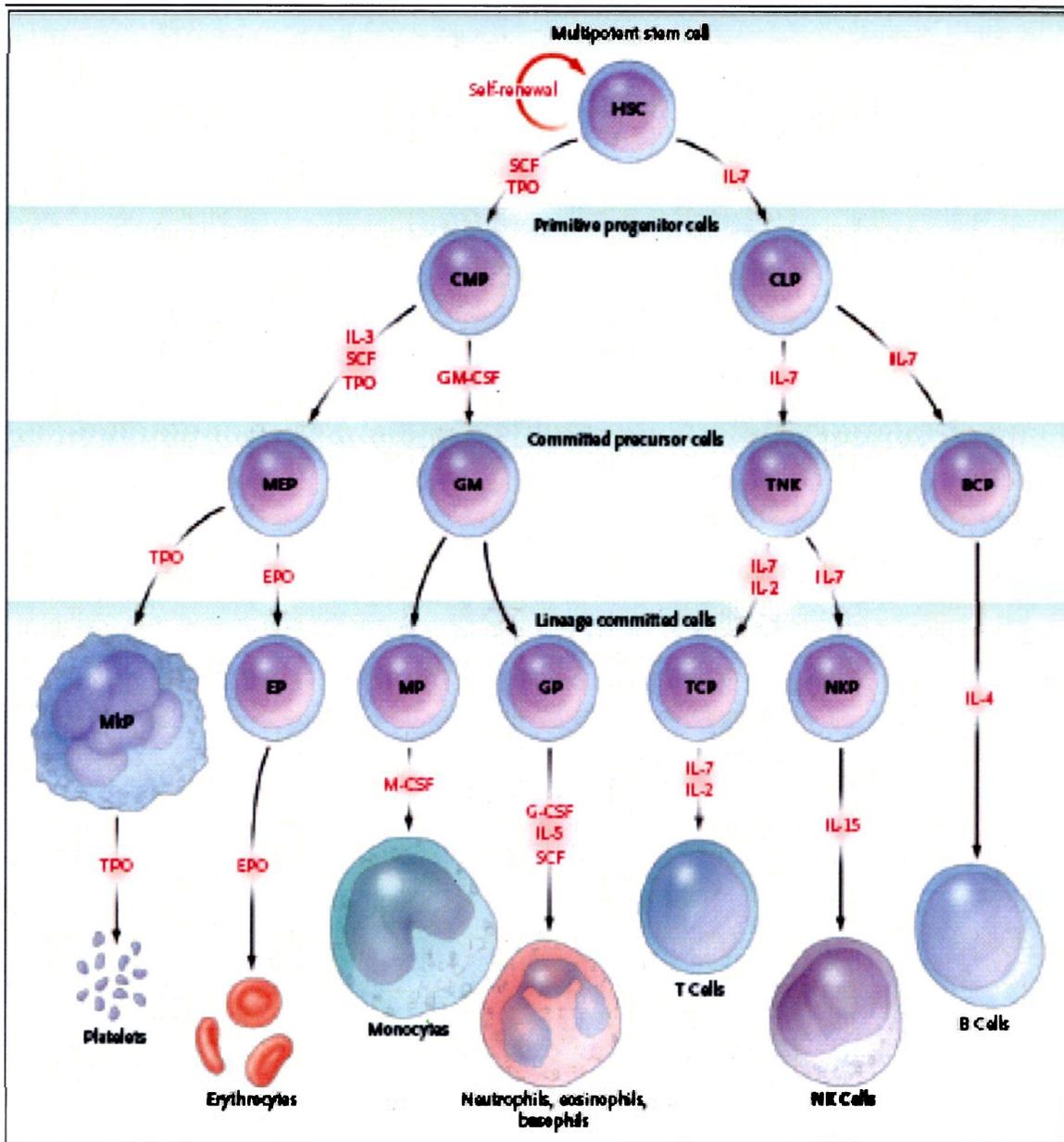


Figure 1.2.1 : Le modèle général de l'hématopoïèse[11] Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont capables de s'auto-renouveler ou de se différencier en plusieurs progéniteurs cellulaires. Elles donnent naissance aux progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et aux progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Ces derniers permettent l'émergence de cellules encore plus différenciées soit les progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), les progéniteurs des macrophages et des granulocytes (GM), les progéniteurs des lymphocytes T et des cellules NK (TNK) et le progéniteur des lymphocytes B (BCP). Ultiment et de façon unidirectionnelle, ces cellules développeront les caractéristiques propres aux progéniteurs des mégacaryocytes (MKP), des érythrocytes (EP), des monocytes (MP) des granulocytes (GP), des lymphocytes T (TCP) et des cellules « Natural killer » (NKP). Au terme de ce modèle général de l'hématopoïèse, les cellules souches hématopoïétiques sont complètement différenciées en éléments terminaux et fonctionnels.

1.2.2 Les cellules souches hématopoïétiques

Les CSHs possèdent deux propriétés essentielles qui garantissent la pérennité de l'hématopoïèse: elles sont capables de s'auto renouveler et de se différencier. En d'autres mots, les CSHs ont la capacité de se multiplier et de maintenir leur caractère multipotent. En plus, elles ont la possibilité de s'engager de façon irréversible dans une voie de différenciation cellulaire qui mènera inéluctablement à une cellule sanguine spécialisée considérée comme élément terminal et fonctionnel[11-17]. Normalement, il existe un équilibre dynamique entre l'auto renouvellement des cellules souches et la perte de celles-ci vers des lignées cellulaires distinctes.

1.2.2.1 L'identification des CSHs

L'identification des CSHs est possible grâce à l'expression des marqueurs CD34 et CD45 à la surface de leurs membranes cytoplasmiques. Habituellement, les CSHs sont appelées cellules CD34 positives (CD34⁺)[19]. Cependant, toutes les cellules qui expriment le marqueur CD34 ne sont pas nécessairement considérées comme CSHs. C'est la fraction CD34⁺ d'un pool cellulaire qui est enrichi en cellules souches[20]. Il est impossible de les distinguer des autres cellules nucléées par la simple observation de leur morphologie cellulaire ou de leur phénotype. L'analyse par cytométrie en flux est jusqu'à ce jour la technique de choix pour identifier les CSHs[19]. Un anticorps couplé à un fluorochrome est dirigé contre un épitope de la molécule CD34. Excité par un faisceau laser, le fluorochrome émet de la lumière et permet de sélectionner les cellules CD34⁺. Cependant, ce marqueur tend à disparaître graduellement de la surface membranaire au fur et à mesure que la cellule se différencie. D'autres marqueurs spécifiques à la lignée cellulaire en développement apparaîtront selon son degré de maturation. [11,14]. Donc, en se différenciant, la CSH se spécialise progressivement mais perd en même temps certaines potentialités hématopoïétiques qu'elle possédait jusque-là.

Quantitativement, les CSHs sont peu abondantes *in vivo*. En effet, elles constituent environ 0.01% des cellules nucléées totales de la moelle osseuse[19,20]. Seulement 5% des CSHs sont en cycle ce qui signifie que la majorité de celles-ci se trouvent en phase G₀, stade de quiescence. Cet état les protège des agents génotoxiques susceptibles

d'endommager leur matériel génétique. De plus, le processus temporairement arrêté de leur développement cellulaire leur accorde plus de temps pour exploiter leur système de réparation d'ADN[21].

1.2.3 La moelle osseuse : site exclusif de l'hématopoïèse

La production de nouvelles cellules sanguines est concentrée dans la moelle osseuse, siège *in vivo* de l'hématopoïèse. Celle-ci offre le microenvironnement idéal pour la génération de lignées cellulaires spécialisées[22,23]. Situé à l'intérieur des os, ce tissu possède des fonctions hématopoïétiques et immunologiques importantes. Chez l'adulte, il y a deux types distincts de moelles: la rouge et la jaune. La moelle rouge des os du crâne, des clavicules, des côtes, des vertèbres, des extrémités supérieures du fémur et de l'humérus et des os iliaques est le points central de l'hématopoïèse. Elle est formée de matière poreuse et spongieuse contrairement à la moelle jaune qui est constituée principalement d'adipocytes et de matières graisseuses compactées[24].

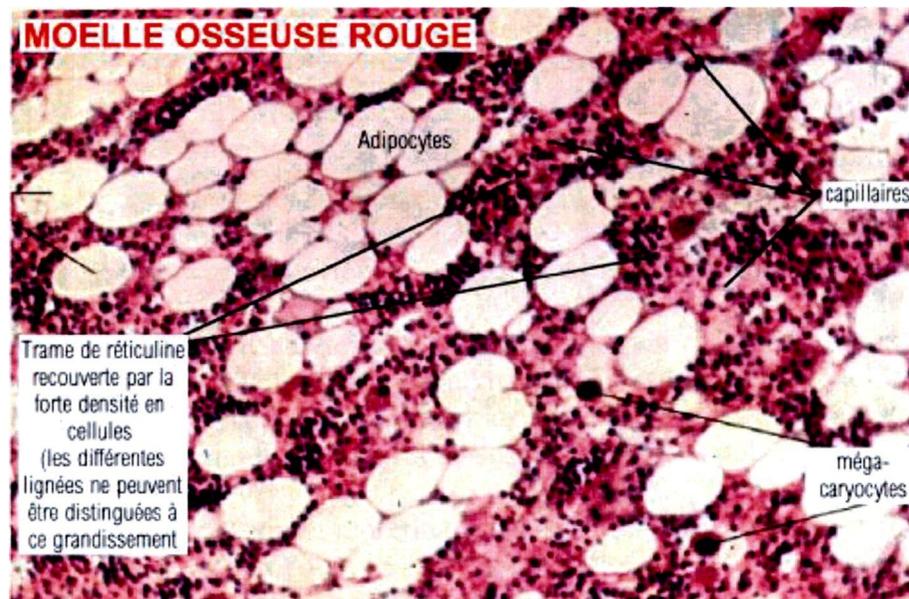


Figure 1.2.3 : Représentation de la moelle osseuse rouge, site *in vivo* de l'hématopoïèse

Figure adaptée du site internet <http://homepage.mac.com>

L'aspect particulier de la moelle osseuse présente une vascularisation considérable où la pression sanguine est accrue étant donné la nature incompressible des os. Elle possède

également un réseau de cellules stromales stimulant l'hématopoïèse[22,23,25]. Les nombreuses ramifications des artères nourricières qui pénètrent à l'intérieur des os facilitent la libération des cellules matures prêtes à exercer leurs nouvelles fonctions. De plus, toutes les substances stimulant la différenciation et la prolifération cellulaires sont transportées via le système vasculaire. Cependant, les processus de multiplication et de différenciation cellulaires au cours de l'hématopoïèse relèvent directement d'un contact étroit entre les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales qui agissent comme tissu de soutien médullaire[24,117]. Que ce soit par le contact avec des molécules d'adhérences (p.e. intégrines VCAM1-VLA4), par la liaison avec la matrice extracellulaire ou par la sécrétion de molécules régulatrices, de cytokines ou de facteurs de croissance (p.e. IL-1, -3, -6, -7, -8, -11, M-SCF, G-SCF, FL, SCF, TPO etc.), la régulation de la maturation des CSHs est essentiellement prise en charge par les cellules qui structurent les niches hématopoïétiques de la moelle rouge[23,26,27].

1.3 La mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est la voie unidirectionnelle de différenciation qui fait partie intrinsèquement du modèle général de l'hématopoïèse. Il s'agit du mécanisme par lequel la CSH se différencie en mégacaryocyte (MC), cellule hautement spécialisée qui a pour unique fonction de produire les plaquettes nécessaires à la coagulation primaire et à la réponse hémostatique[28,29]. Le site *in vivo* où se déroule le programme génétique de différenciation mégacaryocytaire est la moelle osseuse et celle-ci joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la production et de la libération des plaquettes dans la circulation sanguine. Pour parvenir à un MC mature, la CSH doit franchir plusieurs étapes de différenciation.

Tout d'abord, les cellules souches hématopoïétiques doivent s'engager dans la voie de différenciation myéloïde et donner naissance à un progéniteur myéloïde commun (PMC). Par la suite, ce dernier s'engage un peu plus dans la lignée mégacaryocytaire en devenant une cellule commune aux MCs et aux érythrocytes (PCME). En effet, les globules rouges et les plaquettes dérivent tous deux du même progéniteur primitif[11,14]. Cependant, certaines études démontrent que le PMC n'est pas obligatoire pour l'apparition

du PCME et que celui-ci peut directement descendre de la CSH ce qui peut vouloir dire qu'un intermédiaire n'est pas exigé[14,115,116]. L'étape suivante, c'est-à-dire la formation du HPP-CFU-MK (high proliferative potential-colony-forming unit-megakaryocyte) à partir du PCME est nécessaire au développement d'un MC mature. De cette façon, l'engagement de la CSH dans la lignée mégacaryocytaire est irréversible[11-14,18,31].

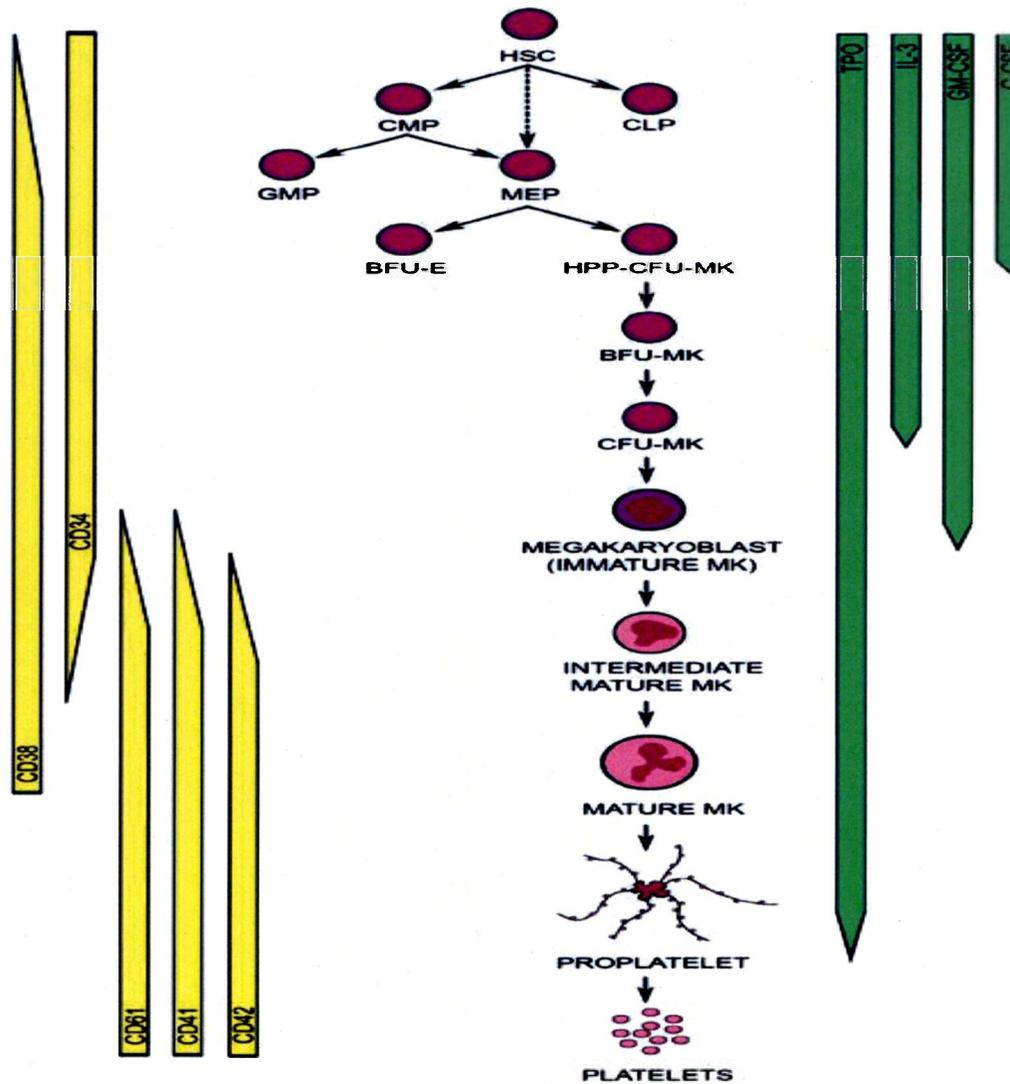


Figure 1.3: La voie de différenciation mégacaryocytaire[14]. Les traits jaunes correspondent aux marqueurs moléculaires qui accompagnent la différenciation mégacaryocytaire. Les traits verts indiquent quant à eux les cytokines nécessaires selon les stades de maturation.

Selon la figure 1.3. de la page précédente, les progéniteurs engagés les plus primitifs menant aux MCs sont appelés HPP-CFU-MK (high proliferative potential colony-forming cells-megakaryocyte), BFU-MK (Burst Forming Unit-Megakaryocyte) et CFU-MK (Colony Forming Unit-Megakaryocyte). Ceux-ci ont une capacité de prolifération élevée. Leurs modes de division est classique ce qui veut dire qu'ils exécutent toutes les phases de la mitose qui aboutissent à la séparation des deux cellules filles génétiquement identiques[30]. Par la suite, ils font place progressivement à des MCs un peu plus différenciés mais encore immatures. Ces derniers portent le nom de promégacaryoblastes (PMKBs) et de MCs intermédiaires matures (MIMs). À ce stade précis de leur différenciation, les PMKBs et les MIMs cessent graduellement de se diviser. Cependant, ils s'engagent dans un cycle cellulaire particulier qui consiste à augmenter de façon substantielle leur contenu génomique et cytoplasmique. Ce phénomène est nommé endomitose et sera traité de manière exhaustive dans les prochaines sections.

1.3.1 La thrombopoïèse

Les dernières étapes de la maturation du MC consistent à libérer, par fragmentation de leur cytoplasme, les plaquettes nouvellement formées. Ce processus est nommé thrombopoïèse[32]. Dans un premier temps, lorsque la cellule est parvenue à augmenter suffisamment son degré de ploïdie et à réarranger son contenu cytoplasmique, elle synthétise une quantité considérable de protéines qui seront destinées aux plaquettes matures et fonctionnelles[32,33]. Une fois le tout réalisé, il y a apparition de membranes de démarcations qui génèrent de longues extensions tubulaires de cytoplasmes nommées proplaquettes. Il s'agit de structures particulièrement dynamiques adoptant des formes allongées ou étalées. Elles comportent des faisceaux de microtubules qui s'enroulent sur eux-mêmes aux extrémités et qui sont dirigés vers la face interne de la membrane cytoplasmique. Ces microtubules, qui prennent naissance à partir des centrosomes, forment ainsi des terminaisons bulbeuses à partir desquelles sont produites les proplaquettes[34,35]. Ces dernières s'allongent à partir du corps du MC à une vitesse moyenne de 0.85micron/min. La croissance et l'extension des proplaquettes s'accompagnent de repliements et de bifurcations répétées résultant en une augmentation importante du nombre de terminaisons[36-38]. La totalité du cytoplasme du MC est convertie en proplaquettes en

l'espace de 4 à 10 heures[34]. Le contenu nucléaire n'est plus sollicité pour la synthèse protéique et il devient inutile. Le noyau d'ADN est pris en charge par d'autres systèmes biologiques pour assurer sa destruction[39]. Les proplaquettes relâchent par leurs extrémités bulbuses des plaquettes individuelles entièrement fonctionnelles ce qui finalise le cycle de la thrombopoïèse tel qu'illustré à la figure 1.3.1.

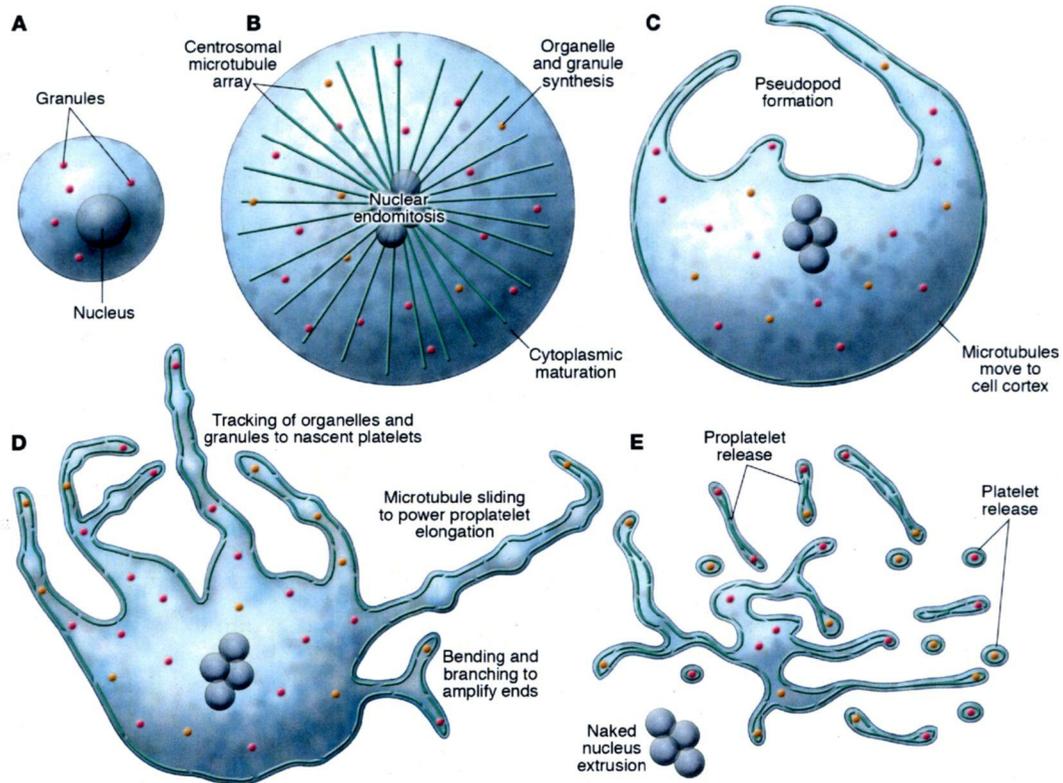


Figure 1.3.1: La libération des plaquettes lors de la thrombopoïèse[35] A) MC immature B) MC engagé dans le processus d'endomitose et de maturation cytoplasmique C) Formation de pseudopodes par l'entremise de la translocation des microtubules au cortex cellulaire D) Élongation des proplaquettes E) La totalité du cytoplasme cellulaire est convertie en plaquettes

1.3.2 Les marqueurs membranaires qui caractérisent la différenciation mégacaryocytaire

Pour être en mesure d'identifier correctement les cellules qui s'engagent dans la lignée mégacaryocytaire, la technique de détection utilisée fait appel au ciblage de

molécules spécifiques qui sont exprimées exclusivement par les MCs. La technologie la plus couramment utilisée est la cytométrie en flux et son principe a été succinctement abordé à la section 1.2.2.1. Au tout début de la mégacaryopoïèse, l'antigène CD34 est exposé à la surface membranaire de la CSH. Il s'agit d'une glycoprotéine (GP) transmembranaire de type I hautement glycosylée[40]. Elle est présente sur une petite population de cellules médullaires. Une de ses fonctions, via son ligand CD62 (L-selectin), serait de jouer un rôle dans l'adhésion avec les cellules endothéliales. Cette molécule tend à disparaître graduellement de la surface membranaire. Au stade du MC mature, l'antigène CD34 n'est plus observable ou presque[41].

Toutefois, la disparition du CD34 coïncide avec l'apparition de molécules caractérisant la lignée mégacaryocytaire. En effet, les marqueurs les plus largement utilisés pour suivre cette lignée sont les CD61, CD41 et CD42[33,42,43]. Au stade du PMKB, le CD61 est exprimé en même temps que le CD41. Ces deux molécules indiquent que le MC est au stade précoce de sa différenciation et qu'il doit être stimulé davantage par certains facteurs de croissance et cytokines. Le CD61 et le CD41 sont respectivement des molécules d'adhésion du type intégrine $\beta 3$ et αIIb . Ensemble, ils forment un récepteur hétérodimérique connu sous le nom de GP IIb/IIIa[44,45]. Ce récepteur est présent des progéniteurs de MCs jusqu'à la surface des plaquettes fonctionnelles. Il tend à être de plus en plus fortement exprimé au fur et à mesure que la différenciation mégacaryocytaire s'accroît[46,47]. La GP IIb/IIIa est reconnue pour adhérer au fibrinogène, à la fibronectine, à la vitronectine et au facteur von Willebrand (vWF)[43,44]. Toutes ces protéines participent activement à la coagulation primaire et à la réponse hémostatique. Un MC mature exprime plus tardivement la molécule CD42 connue aussi sous le nom de GP Ib. Une de ses fonctions jusqu'à maintenant répertoriées est de lier le vWF et il est aussi présent sur les plaquettes nouvellement produites[40].

En résumé, lors de la mégacaryopoïèse, l'expression des molécules mentionnées ci-dessus caractérise le degré de maturité du MC. Ainsi, un MC qui est CD34-CD41+ et CD42+ est considéré mature alors que celui qui est CD34+CD41+CD42- est considéré comme immature[14].

1.3.3 Le facteur biochimique indispensable à la mégacaryopoïèse : la TPO

Tout au long du processus de différenciation, les futurs MCs se doivent d'être stimulés adéquatement par des facteurs de croissance et des cytokines pour mener à terme leur maturation. Il en existe plusieurs qui ont un impact sur la mégacaryopoïèse. Cependant, la cytokine clé est sans contredit la thrombopoïétine (TPO)[32,38]. Depuis sa découverte en 1994 et son clonage réussi par la technologie de l'ADN recombinant, les études de l'effet de la TPO sur le processus de différenciation mégacaryocytaire sont unanimes. En effet, cette cytokine est responsable de la plupart, sinon de toutes les étapes régulant la mégacaryopoïèse. La TPO est nécessaire à l'engagement des CSHs dans la lignée mégacaryocytaire, à la prolifération des progéniteurs primitifs, à l'endomitose, à la maturation du cytoplasme, à l'expression des glycoprotéines de surface et finalement à la production des plaquettes. La survie ainsi que la prolifération des cellules ne dépendent pas uniquement de la TPO mais celle-ci demeure le facteur essentiel pour stimuler la mégacaryopoïèse[48-51].

La TPO est un polypeptide de 353 acides aminés dont les 154 premiers de la portion N-terminale sont identiques à l'érythropoïétine (EPO). Cependant, la portion C-terminale de la TPO est unique et ne correspond à aucune autre protéine jusqu'à maintenant recensée. Elle a un poids moléculaire de 70 KDa et jusqu'à 50% de cette cytokine est glycosylée. Près de la moitié de la production de cette hormone a lieu dans le foie, mais les reins, les muscles squelettiques et les cellules stromales médullaires assurent eux aussi la genèse de la TPO[32,48-51].

1.3.3.1 Le récepteur de la TPO : c-Mpl

Le récepteur de la TPO est connu sous le nom de c-Mpl et le gène codant pour celui-ci est situé sur le chromosome humain 1p34. Il fait partie de la classe I de la superfamille des récepteurs de croissance hématopoïétique. Une fois l'ARN messager du gène épissé et traduit, la protéine résultante est sous forme homodimérique[32,33]. Le récepteur c-Mpl est composé de deux sous-unités et chacune d'elle lie une molécule Janus

kinase 2 (JAK2). En l'absence de la cytokine, le récepteur adopte une conformation ouverte c'est-à-dire prêt à recevoir son ligand[11]. Un fois la liaison établie entre la TPO et c-Mpl, l'homodimère c-Mpl adopte une conformation tridimensionnelle active qui permet le rapprochement des deux molécules JAK2 et celles-ci s'autophosphorylent. Suite à cette modification, la signalisation intracellulaire peut suivre son cours et peut dicter soit la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire. La figure 1.3.3.1 décrit en détails les événements signalétiques intracellulaires mentionnés ci-dessus.

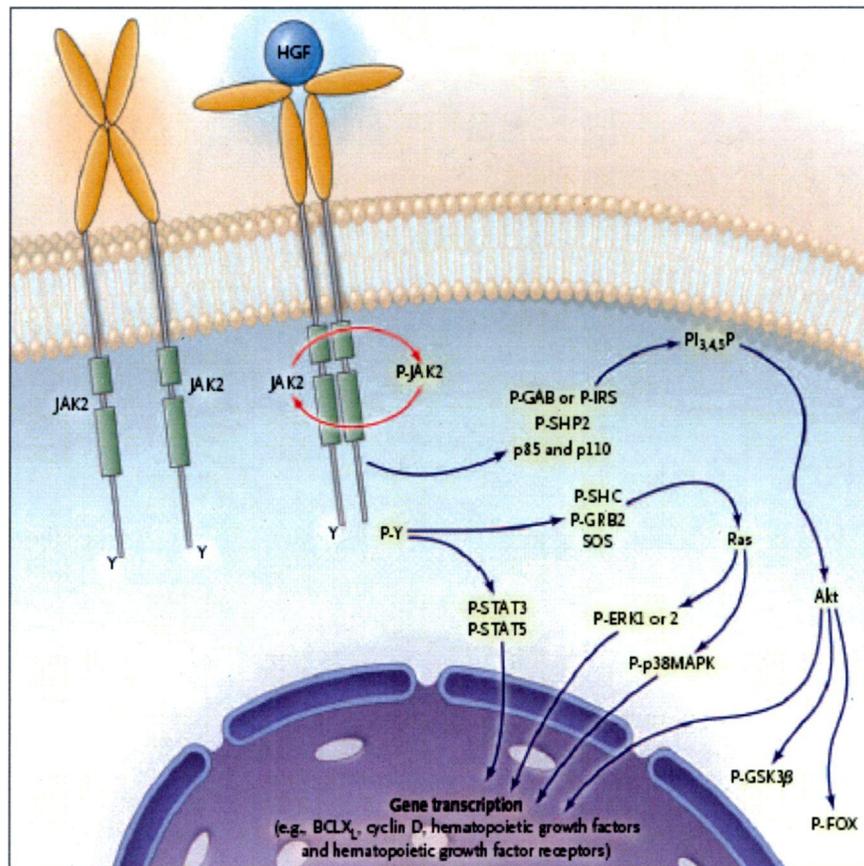


Figure 1.3.3.1 : La signalisation intracellulaire engendrée par la liaison de la TPO avec son récepteur c-Mpl[11] Le modèle ci-dessus illustre la liaison d'une hormone de croissance (HGF) comme la TPO à son récepteur homodimérique. Le contact entre le ligand et son récepteur module la signalisation intracellulaire. Plusieurs intermédiaires moléculaires sont requis avant de pouvoir finalement cibler et activer les gènes spécifiques à la mégacaryopoïèse.

1.3.4: Les facteurs de transcription nucléaire entraînant la différenciation mégacaryocytaire

L'activation de récepteurs tel le c-Mpl via la liaison avec son ligand, la TPO, active non seulement certains sentiers métaboliques importants à la survie mais entraîne aussi l'engagement de certains facteurs de transcription nucléaires qui favorisent la différenciation mégacaryocytaire[14,33,52]

La famille des facteurs de transcription Ets comporte plus d'une trentaine de membres mais seulement quelques-uns sont impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire (PU.1, Ets-1, Tel et Fli-1). Ceux-ci sont capables de lier l'ADN selon une séquence consensus GGAA/T[53-55]. Par contre, Fli-1 semble être un des seuls membres de sa famille à être essentiel. Son importance est capitale car il active plusieurs gènes spécifiques à la lignée mégacaryocytaire. La transcription et la traduction de ces gènes résultent en l'apparition de protéines comme par exemple GATA-1, CD41, CD61 et c-Mpl qui sont directement impliquées dans le processus de la différenciation mégacaryocytaire. Des souris homozygotes négatives pour Fli-1 ne dépassent pas le stade embryonnaire. Elles développent une mégacaryopoïèse disfonctionnelle[56,57]. Jusqu'à maintenant, ce facteur de transcription est reconnu pour promouvoir la différenciation mégacaryocytaire au détriment de la différenciation érythrocytaire[58,59].

Depuis plusieurs années, le facteur de transcription GATA-1 fait l'objet de nombreuses études. GATA-1 est une protéine qui contient deux doigts de zinc : sa portion N-terminale interagit avec un autre facteur protéique nommé FOG-1 et sa portion C-terminale lie l'ADN selon une séquence consensus (A/T)GATA(A/G)[60]. Toutefois, GATA-1 est aussi requis pour assurer la maturation des érythrocytes[61]. Tout comme certains membres de la famille Ets, GATA-1 régule l'expression des gènes indispensables à la lignée mégacaryocytaire (c-Mpl, CD61, CD41, CD42). Il est exprimé à partir du MC immature et cesse de l'être dans les dernières étapes de la maturation. À titre d'exemple, lorsque des souris ont leurs gènes de ce facteur de transcription inactivé, ceci résulte en une

sévère thrombocytopénie et à une accumulation de MCs immatures incapables de produire des plaquettes fonctionnelles[62,63].

Deux autres facteurs nucléaires de transcription sont essentiels à la mégacaryopoïèse: FOG-1 (Friend of GATA-1) et NF-E2 (Nuclear Factor-Erythroid 2). Dans un premier temps, FOG-1 a été initialement découvert par sa capacité à lier le facteur de transcription GATA-1. Son expression coïncide partiellement avec celle de GATA-1 dans les MCs immatures. En d'autres mots, l'apparition de FOG-1 est un peu plus précoce dans le développement des MCs[62,64]. Les modèles de souris utilisés démontrent que l'absence de FOG-1 avorte le processus de la mégacaryopoïèse. Dans un deuxième temps, NF-E2 entraîne les dernières étapes de la maturation des MCs. Cet hétérodimère constitué de la protéine p45 et d'une des sous-unité Maf K ou Maf G cible particulièrement les gènes nécessaires à la maturation du cytoplasme et à l'élongation des proplaquettes[14,62]. NF-E2 est requis pour la libération des plaquettes chez les MCs matures. Des souris homozygotes nulles pour p45 ou les deux autres sous-unités mènent à une thrombocytopénie sévère à cause d'une production plaquettaire insuffisante[65].

Bref, la mégacaryopoïèse n'est pas seulement due à un seul et unique facteur de transcription. Il faut comprendre que chacun de ceux-ci joue un rôle prépondérant dans une ou plusieurs étapes de la différenciation mégacaryocytaire. De plus, ils agissent en synergie les uns avec les autres ce qui a pour effet d'optimiser le processus.

1.4 Les plaquettes: leurs caractéristiques structurales et leurs fonctions physiologiques

Tout d'abord, les plaquettes sont des cellules anucléées. Celles-ci ont une dimensions de 3 microns par 0.5 microns et affichent une morphologie discoïde. À l'intérieur des plaquettes, il est possible de retrouver des mitochondries, des lysosomes ainsi que des résidus de membranes issues du réticulum endoplasmique qui constitue le système dense de membranes[66]. Deux types de compartiments sont présents dans les

thrombocytes: les granules α et les granules denses. Les granules α contiennent des molécules d'adhésion (P-sélectine, intégrine α Ib β 3 etc.). On y retrouve aussi du fibrinogène, de la fibronectine, de la thrombospondine, de la vitronectine et le vWF[67]. Les granules denses quant à elles renferment de la sérotonine, l'agent d'activation soluble ADP et des cations divalent tel le Ca^{2+} [29]. La protéine la plus abondante des plaquettes est sans aucun doute l'actine. Celle-ci, assemblée en filament, forme un réseau complexe de ramifications interconnectées ce qui confère au thrombocyte sa rigidité. Avec en plus un système de microtubules issue du MC, les plaquettes ont un cytosquelette à l'épreuve des forces physiques rencontrées dans la circulation sanguine[29].

Lors de la rupture d'un vaisseau sanguin, les cellules de l'endothélium endommagé exposent des récepteurs qui entrent en contact avec des molécules d'adhérence exprimées sur les plaquettes. Celles-ci sont rapidement séquestrées et activées. Leurs activations leur permet de relâcher le contenu de leurs granules et de réorganiser leur cytosquelette d'actine[67]. Cela a pour effet de recruter plus de plaquettes et d'obstruer efficacement la lésion. La figure 1.4 donne un aperçu de l'agrégation plaquettaire.

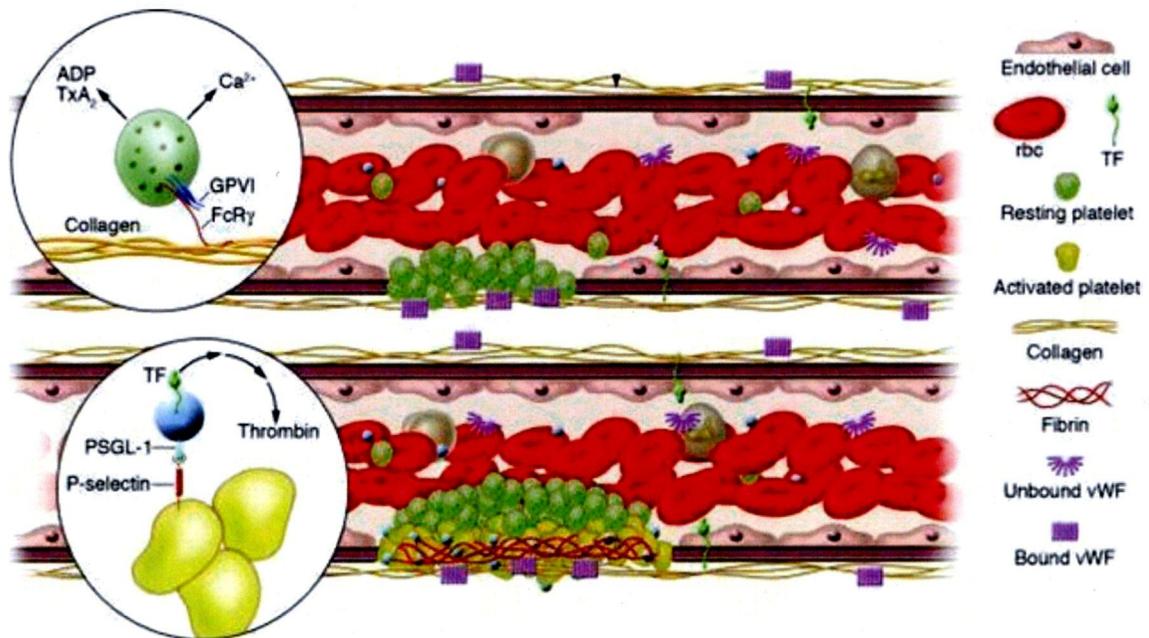


Figure 1.4 L'agrégation plaquettaire au site d'une lésion vasculaire[68]

1.5 Le gigantisme mégacaryocytaire

Une des caractéristiques les plus éloquentes du MC est qu'il devient énorme au terme de son processus de maturation. La taille gigantesque du MC compense son petit nombre. Par exemple, chez un individu adulte de 70Kg, les MCs représentent un faible pourcentage de 0.05% des cellules nucléées de la moelle osseuse. Comparativement aux volumes d'un érythrocyte et d'une plaquette (respectivement de 90 et 8 femtolitre), celui du MC peut atteindre jusqu'à 15 000 fL. Sur un frottis de moelle osseuse, son diamètre oscille entre 50 et 100 microns[69].

1.5.1 L'augmentation de la taille du MC est dépendante de trois phases d'amplification

Tout d'abord, la première étape consiste en la multiplication cellulaire des progéniteurs mégacaryocytaires tel que décrit à la section 1.3. Ensuite, vient le deuxième stade qui est appelé l'endomitose et qui se trouve à être le caractère distinctif de la mégacaryopoïèse[70-72]. Finalement, l'hyperthrophie et la maturation cytoplasmique surviennent lorsque les rondes successives d'endomitose ont cessé. Ultimement, la production plaquettaire et le volume cytoplasmique sont proportionnels au degré de ploïdie de la cellule[69]. La figure 1.5.1 illustre les étapes décrites ci-dessus.

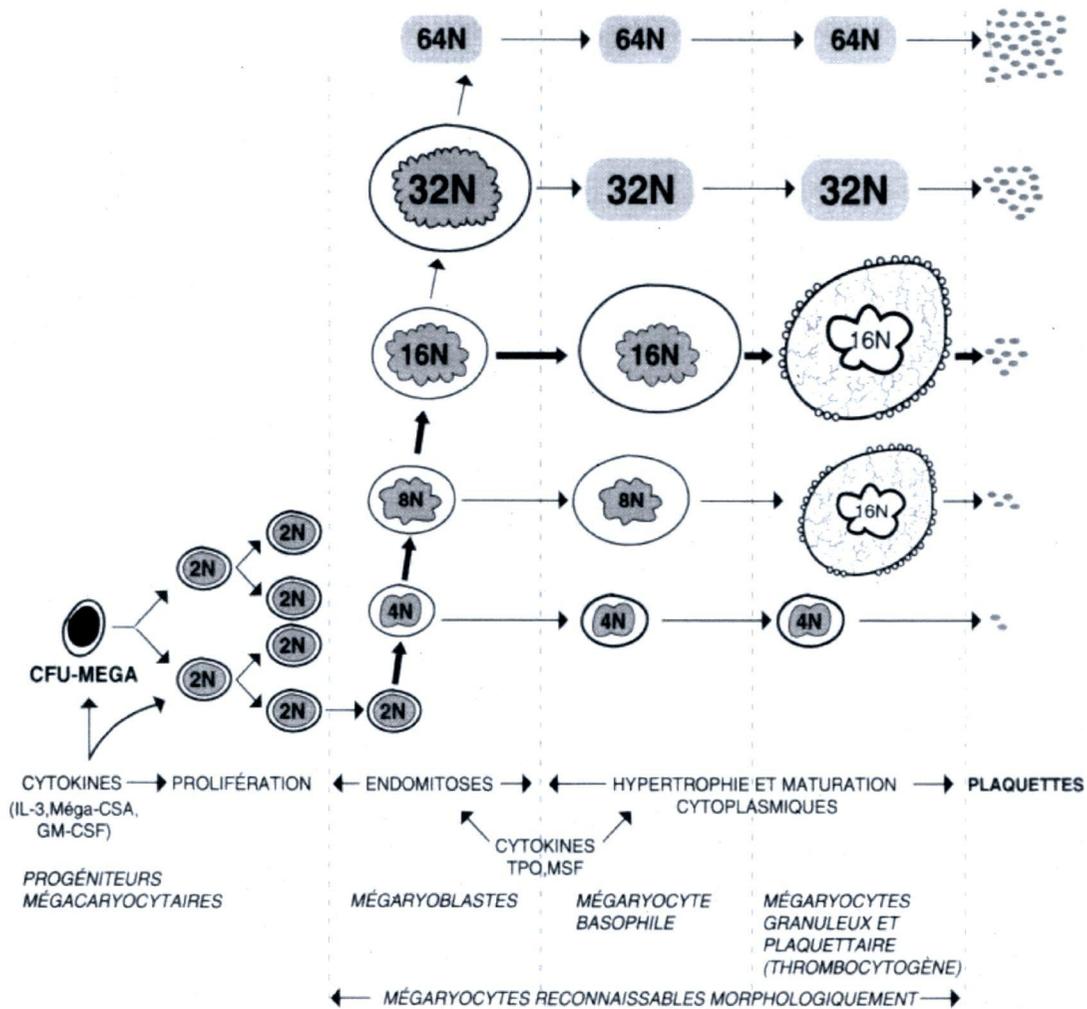


Figure 1.5.1 Les trois phases de l'amplification de la masse mégacaryocytaire[69]

1.6 Un des éléments fondamentaux de la maturation du MC est l'endomitose

Le phénomène d'endomitose est une étape importante de la production plaquettaire. Elle constitue par le fait même la base de cette présente étude. Voici la description exhaustive du processus.

1.6.1 Les principes de bases de la polyploïdisation ou hyperploïdisation

Ce phénomène singulier consiste à augmenter la quantité d'ADN. La plupart des cellules somatiques retrouvées chez les mammifères sont diploïdes, ce qui signifie qu'elles possèdent deux copies identiques de leur génome. L'indication qu'une cellule est diploïde est souvent désignée par le terme $2N$, où N représente l'état haploïde. Peu de cellules spécialisées chez l'homme dépassent cette limite. Il existe pourtant des cas où l'augmentation du degré de ploïdie est naturellement incontournable. Les hépatocytes, les cardiomyocytes, les cellules des muscles lisses et les MCs en sont des exemples[70]. La polyploïdisation présente peu d'avantages au point de vue biologique mais pour certaines cellules qui sont impliquées dans une synthèse protéique massive dans un laps de temps relativement court, cela a pour effet de répondre activement à la demande[69,70,118]. Dans une moelle osseuse normale, 65% des MCs ont une quantité d'ADN de $16N$, 25% ont $32N$ et la majorité des autres ont une masse de $8N$. Les cellules ayant $64N$ et plus sont très peu nombreuses[69,73]. Cela implique un changement dans le contrôle du cycle cellulaire pour parvenir à obtenir une si grande quantité d'ADN.

1.6.2 L'endomitose est le résultat d'un cycle cellulaire unique aux MCs

Les cellules destinées à devenir polyploïdes vont contourner certaines étapes du cycle cellulaire. Dans le cas spécifique du MC, le phénomène favorisant l'augmentation de son degré de ploïdie est appelé endomitose. Les observations démontrent que ce processus est le résultat d'une mitose incomplète[36,74]. En effet, les dernières étapes telles que l'anaphase B, la télophase, la kariocinèse et la cytokinèse ne sont pas complétées[75]. La figure 1.6.2 illustre clairement l'endomitose.

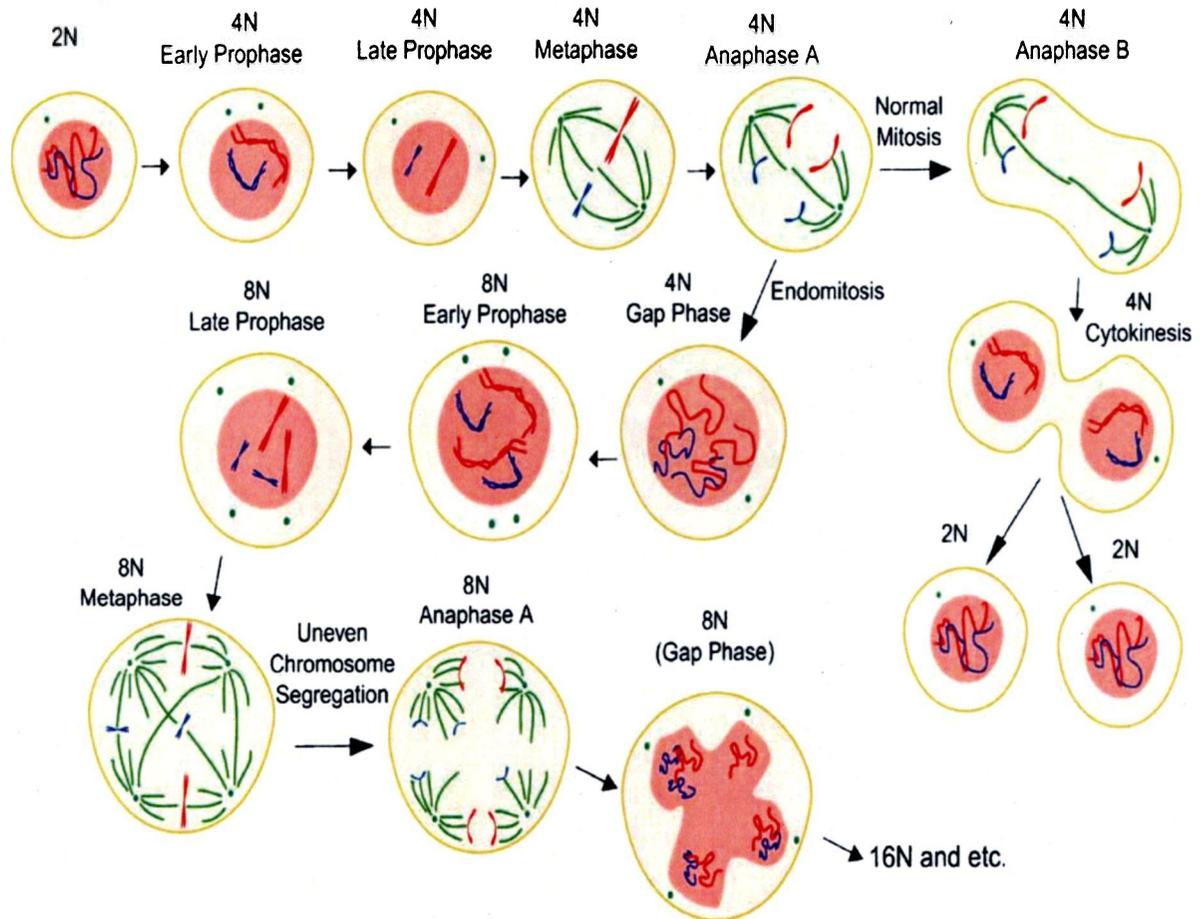


Figure 1.6.2 : L'endomitose est imputable à une mitose inachevée[74]

Les molécules régulatrices du cycle cellulaire modulant l'endomitose et par le fait même le degré de ploïdie mégacaryocytaire font encore l'état de recherches avancées. Toutefois, certaines évidences moléculaires ont été démontrées. En effet, la dégradation active de la cycline B formant un complexe avec la kinase Cdc2 pendant la phase mitotique (G2/M) induit le MC à se réengager en phase S pour répliquer de nouveau son ADN[76-79]. Cela signifie qu'une réduction de l'activité des cycline-dépendante-kinases (Cdk) lors de la mitose est en partie responsable de la polyploïdisation.

Par contre, ce n'est pas le seul modèle qui pourrait expliquer ce que l'on observe chez le MC. Certaines études prétendent que les phases G1/S sont modifiées. Expérimentalement, la cycline D3 qui intervient dans les derniers instants de la phase G1 avec l'aide de sa protéine associée Cdk2 augmente en concentration, imitant ainsi les effets de la TPO ou du phorbol ester. L'activité du complexe D3/Cdk2 est élevée dans les cellules

polyploïdes[79-81]. Bref, les modèles proposés s'accordent sur un même thème: il y a modification du cycle cellulaire.

1.6.3 Le cytosquelette du MC subit une réorganisation structurale majeure lors de l'endomitose

La régulation moléculaire et la dynamique structurale qui animent l'hyperploïdie fait l'objet de plusieurs spéculations. Le lien entre la polyploïdie et le cytosquelette cellulaire est corollaire à l'endomitose.

Il existe des agents protéiques spécialisés dans la régulation de la polymérisation et de la dépolymérisation des filaments d'actine. Plus précisément, la scinderine ainsi que la gelsoline, deux protéines Ca^{2+} dépendantes impliquées dans la séquestration des monomères d'actine et de leur élongation en filaments, ont fait l'objet d'une étude qui démontre que sans leurs activités enzymatiques qui modulent l'actine-F, les MCs étaient incapables de poursuivre les étapes menant à la production de plaquettes[82].

Encore une fois relié à la modification de la structure tridimensionnelle de la cellule, les microtubules ont un rôle important à jouer dans la ségrégation des chromosomes. Les microtubules sont eux aussi régulés par certains éléments comme par exemple la stathmine. Cette protéine est indispensable, car elle régule l'élongation des faisceaux mitotiques lors de la mitose. Des données révèlent que le degré de ploïdie est inversement proportionnel à l'expression de la stathmine dans les lignées mégacaryocytaires et les cellules primaires[75]. Tout porte à croire que la stathmine pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'hyperploïdie mégacaryocytaire.

Un autre fait saillant dans la compréhension de l'endomitose relate la possible activité d'une ou de plusieurs kinases faisant partie de la famille Src. En effet, ces protéines de signalisation intracellulaire sont activement sollicitées lors d'un stress cellulaire[83]. Neuf membres composent cette famille: Src, Fyn, Yes, Lyn, Lck, Blk, Fgr, Hck et Yrk. Ils sont essentiels pour l'activation des voies de signalisation incluant les MAPKs comme

ERK, JNK et BMK1[33,84]. Ils participent aussi à l'activation de JAK1, Ras etc. Les Src kinases sont polyvalentes dans la mesure où elles peuvent déclencher plusieurs voies de signalisation différentes ou les inhiber[85]. Cette famille importante de protéines serait vraisemblablement impliquée dans la polyplœidisation des MCs[84].

1.6.4 Les molécules utilisées en laboratoire pour induire l'hyperplœidie dans les lignées cellulaires

L'utilisation d'inhibiteurs moléculaires est monnaie courante lors d'expérimentations sur des lignées cellulaires humaines. Par exemple, en présence de l'inhibiteur de kinases K-252a, les cellules fibroblastiques de rat et les cellules M07e (lignée megacaryocytaire humaine) développent une hyperplœidie substantielle[70-119]. De plus, l'expression de molécules antisens ciblant p21^{cip-1/waf-1} dans les cellules M07e favorise aussi leur polyplœidisation[120].

L'action de molécules inhibitrices sur l'activité des Src kinases permet de promouvoir l'augmentation du degré de plœidie dans les lignées leucémiques. En effet le PD180970 et le SU6656 sont deux exemples de molécules utilisées pour inhiber les Src kinases[86,87]. Le dernier mentionné est celui qui est le plus récent à être employé dans les laboratoires de recherche. Le SU6656 a une spécificité d'action qui permet aux MCs de devenir polyplœide par le biais d'une endomitose forcée.

1.6.5 Les molécules utilisées en laboratoire pour induire l'hyperplœidie dans les CSHs

Les lignées cellulaires humaines offrent la possibilité de développer des modèles biologiques. Toutefois, l'utilisation de cellules normales, c'est-à-dire sans translocation chromosomique ou aberration génétique, est indispensable pour valider les hypothèses proposées.

La purification de cellules CD34+ est relativement facile à exécuter. En les maintenant dans un milieu de culture favorisant la différenciation mégacaryocytaire et en ajoutant de faibles concentrations de PD98059, un inhibiteur de la voie d'activation MEK1/2, 70% des MCs matures obtenus sont polyploïdes comparativement à 45% des cellules contrôles[86]. Inversement, l'addition de rapamycine, un inhibiteur de mTOR qui est impliqué dans la transition G1/S du cycle cellulaire, empêche les MCs à augmenter leur degré de ploïdie[86].

Une autre information intéressante mentionne que l'ajout de nicotinamide (vitamine B3) dans le milieu de culture des cellules CD34+ favorise leur polyploïdisation ainsi que leur production de proplaquettes. La vitamine B3 est connue pour inhiber la protéine Sir2 qui se trouve à être une histone déacétylase active dans les MCs. Les processus d'endomitose et de production de proplaquettes sont accentués dans les cultures qui emploient la nicotinamide en comparaison aux cultures contrôles[88].

Bref, les étapes menant à un MC polyploïde fait intervenir un cycle cellulaire modifié, une réorganisation des éléments structuraux de la cellule, des molécules de signalisation et l'activation ou l'inhibition de différents sentiers métaboliques. Cependant, les événements cellulaires qui caractérisent la différenciation mégacaryocytaire forment un ensemble indissociable et un seul champ de recherche ne peut donner réponse à toute la complexité entourant le processus en question. Des données supplémentaires sont nécessaires pour étoffer davantage les étapes de la maturation du MC.

1.7 La problématique entourant l'utilisation de CSHs de sang de cordon ombilical pour produire des plaquettes *in vitro*

Les dons de sang de cordon ombilicaux offrent la possibilité de recueillir des CSHs ayant de grandes potentialités de différenciations cellulaires. Il est donc possible de cultiver *ex vivo* ces cellules primaires et de promouvoir leur différenciation mégacaryocytaire en laboratoire. En effet, selon la composition des milieux de culture utilisés et la nature des agents chimiques employés, les CSHs peuvent proliférer et

s'engager dans la mégacaryopoïèse comme leurs homologues retrouvées dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique.

Par contre, deux phénomènes intrinsèquement liés diffèrent entre les cultures de CSHs provenant de sang de cordon (CBs) et les cultures de CSHs issues de donneurs humains adultes (sang périphérique et moelle osseuse) (PBs). Placées dans les mêmes conditions de culture favorisant la différenciation mégacaryocytaire, ces deux sources distinctes de cellules souches répondent différemment aux stimuli qui leur sont imposés. Contrairement aux PBs, la majorité des CBs sont limitées à augmenter leurs degrés de ploïdie. Elles stagnent au stade diploïde de leur maturation[89-91]. La figure 1.7.1 illustre la situation.

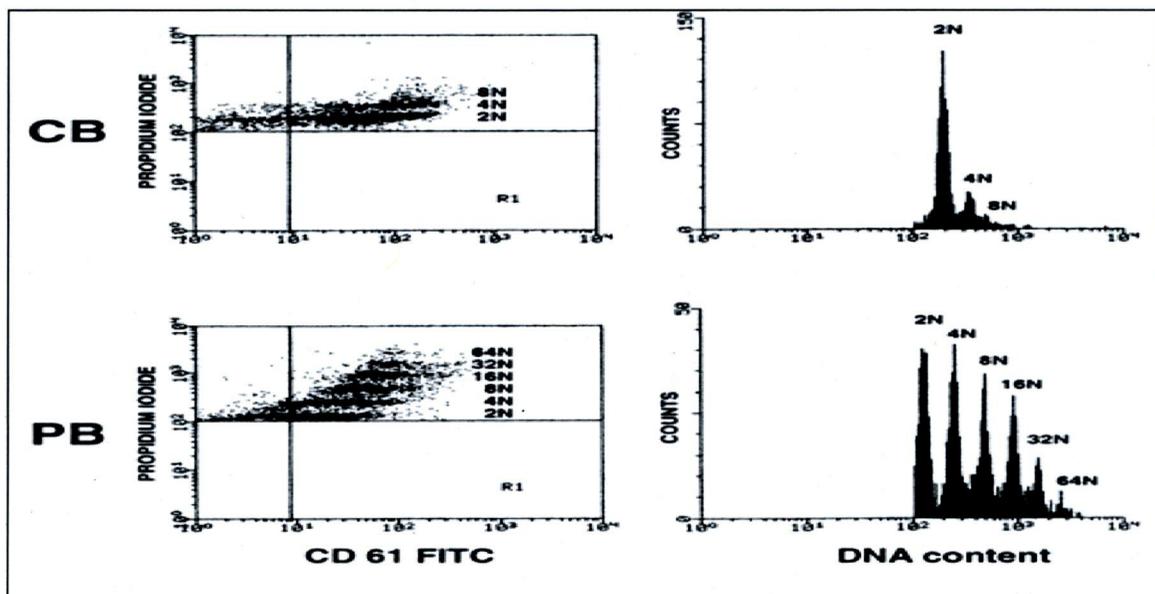


Figure 1.7.1 Les CBs ont une faible propension à devenir polyploïde comparativement à leurs homologues issus de donneurs adultes humains [73]

Conséquemment à ces faits observés, les CBs produisent moins de plaquettes *in vitro* que les PBs qui sont nettement plus nombreuses à être hyperploïdes. La figure 1.7.2 illustre la différence de thrombocytes produits entre ces deux sources de CSHs.

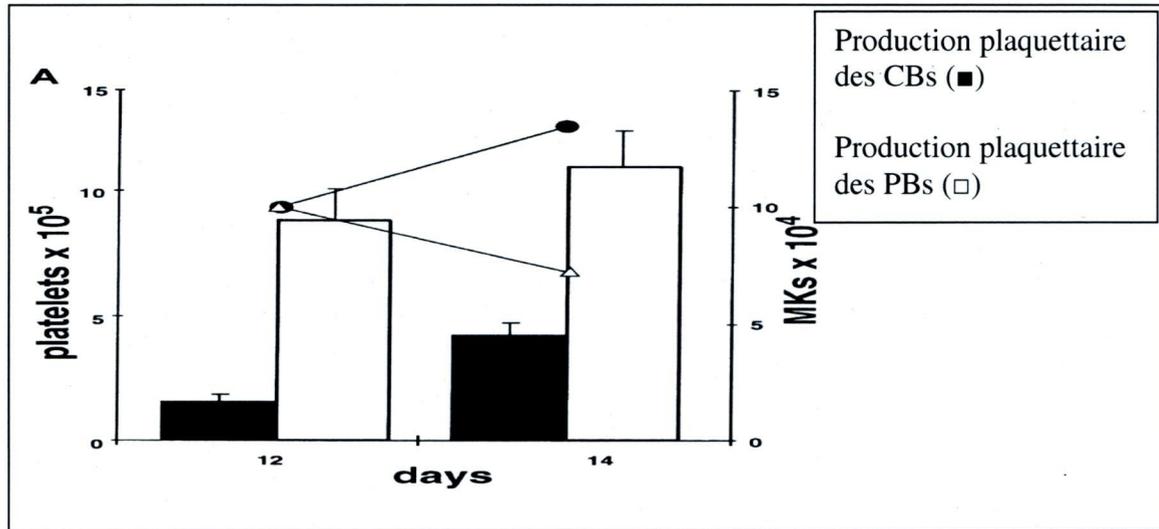


Figure 1.7.2 La production plaquettaire des CBs et des PBs au terme de leur maturation *in vitro*[73]

1.8 L'étude de la cytokinèse apporte des informations structurales supplémentaires en ce qui concerne l'endomitose

La cytokinèse est la dernière étape à franchir pour concrétiser la séparation physique des deux cellules filles lors d'un mode de division classique. Elle assure la partition en quantité égale du contenu génétique et cytoplasmique entre deux cellules indépendantes nouvellement formées. Plusieurs éléments structuraux sont requis pour parachever cette étape. Entre autre, il y a la présence d'un anneau contractile d'actomyosine qui agit comme un étau et qui rapproche les membranes cytoplasmiques opposées afin de former un point d'étranglement[92,93]. La figure 1.8 illustre le phénomène.

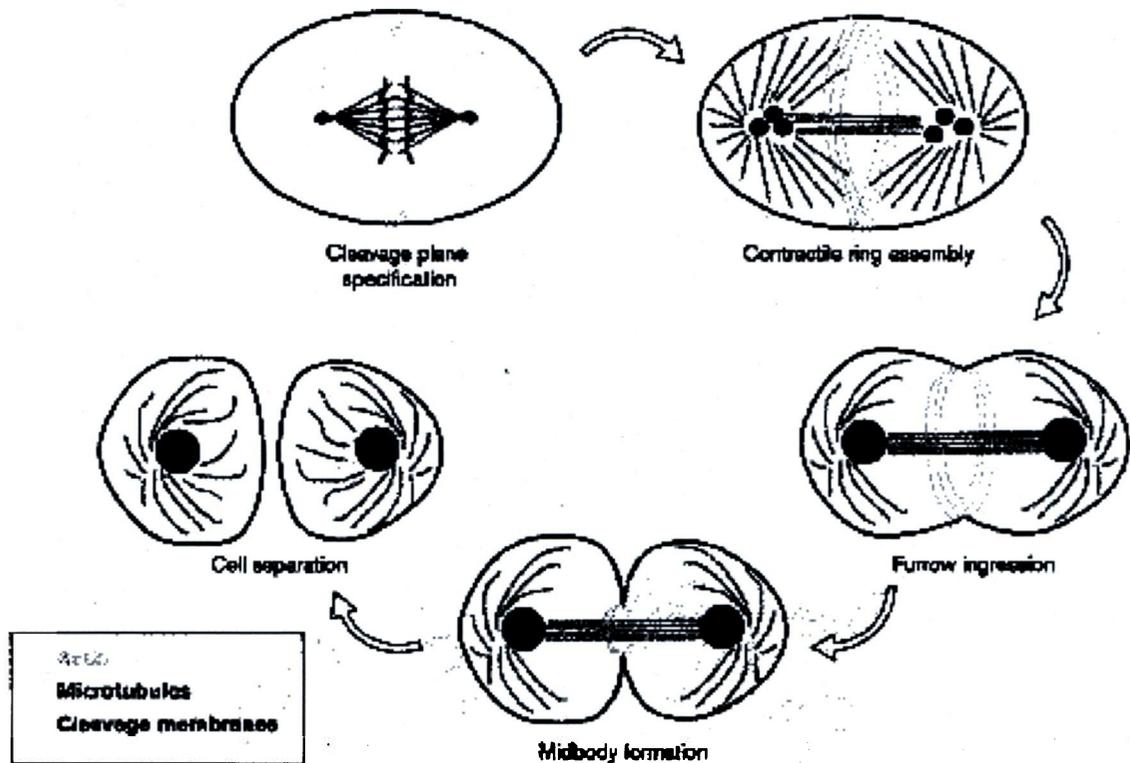


Figure 1.8 Les étapes de la cytokinèse[132]

1.8.1 Les radeaux lipidiques de $PI(4,5)P_2$ s'accumulent au sillon de clivage et sont nécessaires pour compléter la cytokinèse

Lors des dernières étapes de la séparation physique des deux cellules filles, les radeaux lipidiques de $PI(4,5)P_2$ sont recrutés au point d'étranglement[130]. Selon plusieurs observations, ces microdomaines servent de point d'ancrage et d'élément d'activation à une variété de protéines impliquées dans la modulation de la réorganisation du cytosquelette d'actine, processus incontournable lors la cytokinèse. L'action de l'anneau contractile est par le fait même soutenue physiquement par ces radeaux[94,131].

1.8.2 L'étude de la polyploïdisation par les radeaux lipidiques de $PI(4,5)P_2$

L'endomitose dans les MCs en maturation est caractérisée par une cytokinèse déficiente ce qui donne naissance à de larges cellules polyploïdes. Certaines équipes de

recherche ont démontré l'absence de la formation du sillon de clivage possiblement causée par l'inactivation ou la délocalisation de protéines régulatrices nécessaires à la complétion de la cytotinèse[95,96]. Il a été mentionné précédemment que les microdomaines de PI(4,5)P₂ s'agglomèrent au point d'étranglement au terme de la cytotinèse. Dans la littérature, plusieurs protéines sont connues pour cibler spécifiquement ces radeaux lipidiques. Par exemple, GAP-43, MARCKS et CAP-43 peuvent lier les microdomaines de PI(4,5)P₂ parce qu'elles sont modifiées post-traductionnellement ce qui leur confère cette habileté. En effet, elles subissent une ou plusieurs acylations (ajout d'acide gras) sur des acides aminés bien précis[98,99].

1.8.3 La portion N-terminale de GAP-43 : un outil moléculaire potentiel pour l'étude du sillon de clivage

La molécule GAP-43 est une protéine bien caractérisée tant au niveau de sa localisation que de sa fonction[96-101]. Elle est normalement active dans les cellules neuronales. Son importance est capitale car elle module la réorganisation du cytosquelette d'actine dans ces cellules. Plus important encore, c'est grâce à ses 24 premiers acides aminés qu'elle est en mesure de cibler directement les radeaux lipidiques de PI(4,5)P₂. Notamment, sur les cystéines en position 3 et 4, il y a ajout d'acide palmitique[102-103]. Ces modifications sont réversibles. Cette double palmitoylation confère au peptide l'opportunité de s'accrocher aux microdomaines lipidiques pour ainsi solidifier sa liaison hydrophobe. Toutefois, il n'y a pas de domaine catalytique présent sur ses 24 premiers acides aminés. Jusqu'à preuve du contraire, cette portion de la protéine ne fait que s'accrocher sélectivement aux radeaux lipidiques d'où son nom MTPG-43 (**M**embrane **T**argeting **P**eptide of **G**AP-**43**). Étonnement, l'utilisation de cet outil moléculaire a mené à des effets hors du commun et ces observations ont été effectuées fortuitement par l'équipe du Dr Côté. La figure 1.8.3 représente la séquence en acides aminés du peptide, sa double palmitoylation et ses principaux domaines. Le tableau 1 décrit les paramètres physico-chimiques du peptide MTPG-43 calculés.

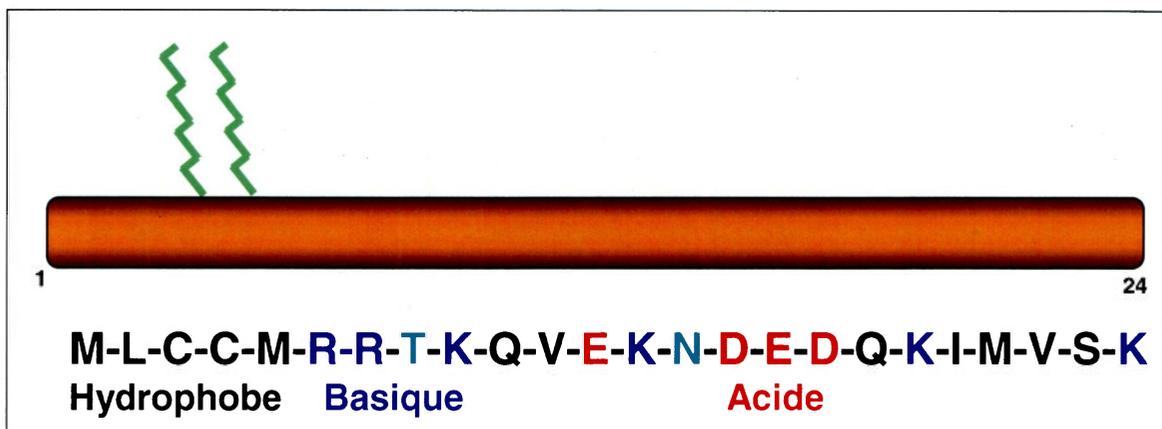


Figure 1.8.3 : Le peptide MTPG-43[103]. Les acides aminés qui le composent sont : méthionine (M), leucine (L), cystéine (C), arginine (R), thréonine (T), lysine (K), glutamine (Q), valine (V), acide glutamique (E), asparagine (N), acide aspartique (D), isoleucine (I), sérine (S)

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques du peptide MTPG-43*

Nombre d'acides aminés	24
Poids moléculaire	2957.4 Da
Nombre de résidus acides	6 (25%)
Nombre de résidus basiques	5 (20.8%)
Point isoélectrique théorique	4.99
Estimé de la demi-vie	<p>≈30 heures (réticulocytes de mammifères <i>in vitro</i>)</p> <p>> 20 heures (levure <i>in vivo</i>)</p> <p>> 10 heures (<i>E.coli in vivo</i>)</p>
Moyenne d'hydropathicité	- 1.267 (classé hydrophile)
Indice d'instabilité	+ 62.35 (classé instable <i>in vitro</i>)

* Paramètres calculés selon le logiciel Protparam (www.expasy.org/tools/protparam.html)

1.9 Les objectifs du projet de maîtrise

Le mécanisme d'endomitose lors de la différenciation mégacaryocytaire demeure jusqu'à ce jour un processus incompris. Le casse-tête moléculaire à la base de l'augmentation du degré de ploïdie et du volume cytoplasmique n'est que partiellement assemblé. En effet, il manque des éléments de réponses concernant la régulation des gènes lors de la mégacaryopoïèse. De plus, il y a peu d'informations entourant la dynamique structurale qui animent la polyploïdisation du MC. Certes, il existe des études qui relatent l'importance de certaines protéines endogènes mais très peu font mention de l'organisation de l'échafaudage cellulaire qui permet l'hyperploïdie et le gigantisme cellulaire. Ce projet de maîtrise met l'accent sur le développement d'un outil moléculaire potentiel pouvant forcer l'endomitose de façon non spécifique et du même coup fournir quelques éléments de réponses sur les possibles rôles de certaines structures intracellulaires dans la polyploïdisation du MC.

L'hypothèse de travail est la suivante : La saturation des radeaux lipidiques de PI(4,5)P₂ par MTPG-43 à l'endroit où se forme le sillon de clivage empêche la cellule de mener à terme sa division cellulaire. Une cytokinèse incomplète force l'hyperploïdie et l'augmentation du volume cytoplasmique des cellules qui expriment le peptide.

Pour parvenir à valider cette conjecture, différentes constructions plasmidiques contenant le transgène MTPG-43 ont été réalisés. Par électroporation, des lignées stables de clones ont été créées à partir de la lignée cellulaire humaine K562. Il s'agit d'une lignée bipotentielle capable de se différencier en MC ou en érythroïdes. Les clones ont exprimés le peptide fusionné ou non à un marqueur fluorescent. Par le biais de la microscopie à fluorescence et de l'immunofluorescence, la localisation ainsi que l'agglomération de différentes versions de protéines ayant en commun le peptide MTPG-43 ont pu être observées. La viabilité et le taux d'expansion des clones utilisés ont été analysés par l'exclusion du bleu de Trypan. Des analyses plus poussées ont été effectuées par la technologie de la cytométrie en flux pour déterminer s'il y a eu augmentation du volume cytoplasmique et polyploïdisation nucléaire.

La mutagénèse dirigée a permis de modifier certaines particularités du peptide pour constater les effets phénotypiques engendrés sur différentes lignées cellulaires dont les cellules K562, HEK-293 et COS-7. Grâce aux transfections transitoires générées par électroporation ou par la technologie des liposomes, certains acides aminés ont pu être ciblés comme étant essentiels à l'ancrage du peptide à la membrane cytoplasmique.

Finalement, un vecteur d'expression adénoviral exprimant MTPG-43 a été construit. Ce virus a été créé dans le but d'infecter des cellules CD34+ en cours de différenciation mégacaryocytaire *in vitro*. Afin de vérifier l'effet du peptide, plusieurs paramètres ont été analysés dont le degré de ploïdie nucléaire ainsi que le nombre de plaquettes par cellules souches de sang de cordon CD34+ensemencées. Après analyses des résultats, un regard objectif a été porté sur l'utilisation du peptide ainsi que sur la justification de poursuivre les expériences avec cet outil moléculaire.

2 Matériel et méthodes

2.1 Les lignées cellulaires et leurs conditions de culture

Dans le cadre de ce projet, 5 lignées cellulaires ont été utilisées : M07e, K562, HEK 293, COS-7 et QBI 293A. Les cellules M07e (DSMN N° ACC 104) ont été cultivées à 37°C dans le milieu IMDM (GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y. USA) supplémenté de 10% de FBS(GIBCO) et de 10ng/mL d'IL-3 (Préprotech) à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 10% de CO₂. Elles ont été diluées à tous les 5 jours pour ainsi être ramenées à une densité cellulaire d'environ 250 000 cellules/mL. Les cellules K562 (ATCC : CCL-243) ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 10% de CO₂ supplémenté de 5% de FBS. Elles ont été diluées à tous les 3 jours. La densité cellulaire finale après dilution a été environ de 100 000 cellules/mL. Les cellules HEK 293 (ATCC : CRL-273) COS-7 (ATCC : CRL-1651) et QBI 293A (QBiogen) sont des lignées cellulaires adhérentes. Toutes les trois ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 10% CO₂. Ces trois lignées cellulaires ont été diluées à tous les 3 jours à une densité cellulaire finale de 100 000 cellules/mL. Avant de procéder aux dilutions, les cellules adhérentes ont été lavées deux fois avec du PBS-glucose (2g/L glucose, 9.55 Dubelco's PBS pH 7.4 et 125µL/L phénol rouge 0.5%). L'utilisation d'un mL de trypsine(GIBCO) a été nécessaire afin de permettre le décollement des cellules de la surface de leur support. Les cellules adhérentes ont été incubées à 37°C pendant 2 minutes afin de laisser agir la trypsine. Le nombre de cellules désirées a été réensemencé dans du milieu DMEM (GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y. USA). La viabilité des cellules a été évaluée par l'exclusion du colorant nommé Bleu de trypan à 0.4% (p/v)(GIBCO BRL). Les cellules ont été déposées sur un hémacytomètre (Hausser Scientific, Horsham, PA) et observées par microscopie à contraste de phase. Les cellules bleues ont été considérées mortes tandis que les blanches ont été considérées viables. Les comptes cellulaires ont été effectués en triplicata avec un écart inférieur à 10%.

2.2 Les digestions avec les enzymes de restriction

Les constructions plasmidiques réalisées dans le cadre de ce projet ont été majoritairement directionnelles. En d'autres mots, les sites de restriction sélectionnés se devaient d'être uniques et présents à chacune des extrémités de l'insert et du vecteur.

La digestion de l'ADN se faisait selon le protocole du fabricant. Le tampon utilisé variait en fonctions des enzymes utilisées. La concentration finale du tampon était de 1X dans le mélange réactionnel. La quantité d'enzyme ajoutée au mélange a été calculée pour utiliser 1 unité par μg d'ADN à digérer. La réaction enzymatique a été placée à 37°C pendant 60 minutes tel que recommandé.

2.3 Ligation à l'aide de la ligase du phage T4

La ligase du phage T4 catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'OH et 5' phosphate de l'ADN digéré. Il est donc possible de lier un bout d'ADN tel un insert à un plasmide préalablement digéré. La liaison est possible entre deux extrémités cohésives ou franches.

Le ratio qui a été privilégié a été de l'ordre 1:3, c'est-à-dire une extrémité moléculaire de plasmide pour trois extrémités moléculaires d'insert. Le tampon de ligation (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, pH 7.5) en présence de 200 unités de ligase T4 (NEB). Le mélange réactionnel a été placé à la température pièce et utilisé 14 à 16 heures plus tard.

2.4 Précipitation à l'éthanol des vecteurs plasmidiques

Des vecteurs plasmidiques et des inserts ont été isolés par la méthode suivante : 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH 5.2 et 2.5 volumes d'éthanol 95% ont été ajoutés aux échantillons. Les mélanges ont été incubés sur glace pendant 10 minutes. Ensuite, ils ont été centrifugés dans une microcentrifugeuse Eppendorf modèle 5415C à température ambiante pendant 10 minutes. Les culots ont été lavés à l'éthanol 70% afin

d'enlever toutes traces résiduelles de sel. Une seconde incubation des culots à la température pièce a été nécessaire pendant 5 minutes. Les échantillons ont été recentrifugés pendant 10 minutes. L'éthanol a été retiré et les culots séchés. À la toute fin, les culots ont été resuspendus dans de l'eau.

2.5 Électrophorèse, extraction sur gel d'agarose et purification des acides nucléiques avec la trousse QIagen

Les échantillons d'ADN à purifier ont été déposés sur un gel d'agarose à 1% (Invitrogen, Burlington, ONT, Canada) dans une tampon TAE 1X (4.84g/L Tris, 11.42mL/L acide acétique glaciale et 2mL/L d'une solution d'EDTA 500mM pH 8.0) et tamisés par électrophorèse suite à l'application d'un courant électrique de 100 volts au système. Les fragments d'ADN d'intérêts ont été colorés au SYBR Gold(Molecular Probes) et identifiés à l'aide d'une échelle de poids moléculaire. Ils ont été ensuite découpés à même l'agarose. Les fragments d'ADN ont par la suite été libérés de l'agarose grâce à l'utilisation de la trousse d'extraction QIAEX II Agarose Gel Extraction. Les échantillons ont été purifiés selon le protocole du fabricant. Chaque morceau d'agarose découpé a été déposé individuellement dans des tubes Eppendorf d'une capacité de 1.5mL auquel 3 volumes de tampon QX1 et entre 10 μ L et 30 μ L de microbilles QIAEX II ont été ajouté (selon la quantité d'ADN à purifier, 10 μ L pour 2 μ g et moins d'ADN et 30 μ L pour 2 à 10 μ g d'ADN). Pendant l'incubation de 10 minutes à 55°C, les échantillons ont été mélangés vigoureusement à toutes les 2 minutes jusqu'à ce que les morceaux d'agarose aient été complètement digérés. Les tubes ont par la suite été centrifugés dans une microcentrifugeuse Eppendorf modèle 5415C pendant 1 minute. Le surnageant a été enlevé et les culots lavés avec le tampon QX1. Par la suite, 2 autres centrifugations ainsi que 2 autres lavages ont été nécessaires mais cette fois avec le tampon PE (80% éthanol). Les culots ont ensuite été séchés à l'air à température pièce jusqu'à ce qu'ils deviennent blancs. Finalement, les culots séchés ont été resuspendus dans une solution à 10mM Tris-HCl pH8.5 ou dans de l'eau et incubés à température pièce pendant 5 minutes. Ils ont été centrifugés à nouveau et les surnageants récupérés car ceux-ci contenaient les fragments purifiés. Les surnageants ont été placés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.6 Utilisation de bactéries chimiocompétentes DH5 α

Un volume de 50 μ L de bactéries DH5 α a été décongelé sur glace. Ensuite, entre 1 et 10ng d'ADN plasmidique a été mélangé de façon stérile aux bactéries. Le tout a été incubé sur glace pendant 30 minutes. Au terme de cette période temps, le tube Eppendorf dans lequel se trouvait le mélange a été plongé dans un bain-marie à 37°C pendant 20 secondes. Après ce choc thermique qui a permis à l'ADN de pénétrer à l'intérieur des bactéries chimiocompétentes, celles-ci ont été réincubées sur glace pendant 2 minutes. Le mélange bactéries/ADN à par la suite été déposé du milieu SOC stérile(0.5% extrait de levure, 2%tryptone, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucose) préchauffé à 37°C. Pendant 1 heure, le milieu de culture s'est fait agité à 225rpm à 37°C (Innova 4000, New Brunswick Scientific CO inc; Edison, NJ, USA) et un aliquot a été déposé sur un pétri LB-agar ampiciline(1% tryptone (p/v) et 100mg/mL d'ampiciline (Sigma). L'incubation du pétri a duré toute une nuit dans un incubateur à 37°C (1525 Shel Lab : Corneluis, Oregon, USA).

2.7 Mini-préparations d'ADN plasmidique

Les unités formatrices de colonie (UFCs) visibles après une incubation à 37°C ont été considérées comme étant positivement transfectées étant donné leur résistance à l'ampiciline. Afin de vérifier l'insertion épisomique du plasmide à l'intérieur des bactéries DH5 α , une mini-préparation d'ADN plasmidique s'est imposée.

Une UFC a tout d'abord été prélevée du pétri de façon stérile etensemencée du milieu LB (1%tryptone, 0.5% extrait de levure, 0.5% NaCl, 100mg/mL d'ampiciline). Ce milieu de culture a été incubé pendant 18 heures à 37°C (Innova 4000, New Brunswick Scientific CO inc; Edison, NJ, USA). Quelques millilitres de la culture bactérienne ont été transférés dans un tube Eppendorf. Celui-ci a été placé dans une microcentrifugeuse Eppendorf modèle 5415C pendant 1 minute à vitesse maximale. Le surnageant a été retiré et le culot bactérien a été resuspendu dans une solution TEG (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) et incubé à température pièce pendant 5 minutes. Par la suite, une solution 0.2N NaOH, 1% SDS fraîchement préparée a été ajoutée et mélangée

par inversions répétées du tube. Le tout a incubé sur glace pendant 5 minutes. Une solution d'acétate de sodium 3M pH 5.2 a ensuite été ajoutée. Le mélange a été agité par inversion et déposé sur glace pendant 5 minutes. Le mélange a été centrifugé à nouveau à vitesse maximale. Le surnageant a été déposé dans un nouveau tube Eppendorf. Ce surnageant contenait l'ADN. La précipitation de celui-ci a été effectuée avec de l'éthanol 95%. Le tube qui contenait l'ADN a été incubé sur glace pendant 50 minutes et centrifugé pendant 5 minutes à vitesse maximale. Le culot résiduel (ADN) a été lavé avec de l'éthanol 70% afin d'enlever les traces de sel, recentrifugé à vitesse maximale et le surnageant a été retiré. Bien séché à l'air libre pendant 20 minutes, le culot a été resuspendu dans du tampon TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0). Pour terminer, de la Rnase A (2mg/mL) a été ajouté afin d'éliminer les traces d'ARN qui auraient pu être présent dans le mélange final.

2.8 Midi-préparations d'ADN plasmidique

Une quantité suffisante de vecteur est essentielle pour les nombreuses transfections et le séquençage. C'est pourquoi des midi-préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées avec la trousse QIAfilter Midi (QIAGEN plasmide purification).

Pour y parvenir, du milieu LB (1% tryptone, 0.5% extrait de levure, 0.5% NaCl) auquel 100mg/mL d'ampicilline a été ajouté a étéensemencé avec de la culture bactérienne fraîche (dilution 1/500 tel que recommandé par le fabricant) et incubé à 37°C avec agitation à 225 rpm (Innova 4000, New Brunswick Scientific CO inc; Edison, NJ, USA) pendant 16 à 18 heures. Au terme de cette incubation, la culture bactérienne a été centrifugé à 7000 g (Sorvall GSA RC2-B, Mandel Scientifique Compagny Ltd : Guelph, ONT, Canada) pendant 15 minutes à 4°C. Le culot bactérien a par la suite été resuspendu du tampon P1 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100µg/mL Rnase A) jusqu'à dissolution complète du culot. La seconde étape a consisté à ajouter du tampon P2 (200mM NaOH, 1% SDS) et de bien mélangé en inversant le tube de 4 à 6 fois. Une incubation de 5 minutes à température pièce a suivie cette étape. Du tampon P3 (3M acétate de potassium pH 5.5) a été ajouté au tube et celui-ci a de nouveau été inversé délicatement quelques fois. Le lysat bactérien a été transféré dans le QIAfilter Cartridge et laissé à température pièce pendant 10

minutes. Pendant ce temps- la colonne QIAGEN-tip 100 a été équilibrée avec du tampon QBT. À l'aide d'un piston de seringue, la solution demeurée dans le QIAfilter a été filtré et le liquide résiduel a été déposé dans la colonne QIAGEN-tip 100 préalablement équilibrée. L'éluat de l'ADN a été effectuée à l'aide du tampon QF appliqué à la colonne QIAGEN-tip 100. Pour précipiter l'ADN, de l'isopropanol a été ajouté à l'éluat recueilli dans un tube de verre. Ensuite, la solution a été centrifugée à 16 000 pendant 30 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Beckman modèle J2-21. Le surnageant a été retiré délicatement et le culot a été lavé avec de l'éthanol 70% et recentrifugé à 16 000g pendant 10 minutes. L'éthanol 70% a été enlevé et le culot bien séché à l'air libre. L'ajout de tampon TE a permis de resuspendre l'ADN. La concentration d'ADN a été dosée par l'appareil Nanodrop(Nanodrop Technologies) et placé à -20°C pour utilisation ultérieures.

2.9 Cytométrie en flux

2.9.1 Analyse du degré de ploïdie par coloration à l'iodure de propidium

Entre 2×10^5 et 1×10^6 cellules ont été centrifugées 5 minutes dans une Immunofuge II (Baxter, Mississauga, ONT, Canada) à basse vitesse. Le culot cellulaire a par la suite été lavé avec du PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH7.4). Recentrifugées à nouveau, les cellules ont été resuspendues dans 100 μL de PBS+900 μL d'éthanol 70%. Le tout a été incubé à la température pièce pendant 10 minutes avant d'être lavé une fois de plus avec du PBS et centrifugé. Le culot qui en a résulté a été resuspendu dans une solution PI/Triton X-100 (0.5 μL Triton X-100, 25 μL Rnase A-Dnase free 2mg/mL, 10 μL PI 1mg/mL et 464.5 μL PBS). Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux avec l'appareil FACSCalibur (Becton-Dickinson). Le logiciel CELLQUEST a été utilisé pour l'acquisition des données. Ces mêmes données ont pu être analysées par le logiciel FACS Express 3.0.

2.9.2 Énumération plaquettaire

Au terme de la culture des CSHs différenciées en MCs, le nombre de plaquettes a été quantifié. Au jour 14, le mélange cellules/plaquettes a été placé dans un tube pour FACS. Le mélange suivant a été préparé (anti CD41 PerCP-Cy.5(BD Pharmingen) + anti CD42 APC(BD Pharmingen) + IP + Tampon MK 1X) et ajouté au tube contenant les cellules. Les cellules ont été incubées à l'obscurité à la température pièce pendant 30 minutes. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux avec l'appareil FACSCalibur (Becton-Dickinson). Le logiciel CELLQUEST a été utilisé pour l'acquisition des données. Ces mêmes données ont pu être analysé par le logiciel FACS Express 3.0.

2.9.3 Analyse de la taille cellulaire relative

Environ 5×10^5 cellules ont été prélevées du milieu de culture. Aucune centrifugation et aucun lavage n'ont été nécessaires. Les cellules ont été directement placées dans un tube pour FACS et analysées par cytométrie en flux avec l'appareil FACSCalibur (Becton-Dickinson) selon le paramètre FSC-H. Le logiciel CELLQUEST a été utilisé pour l'acquisition des données. Ces mêmes données ont pu être analysé par le logiciel FACS Express 3.0.

2.10 Coloration des cellules par immunoflorescence

Ce type de coloration permet de visualiser certaines structures cellulaires désirées. Les cellules ont été diluées dans du PBS-glucose et un volume prédéterminé de cette dilution a été déposé sur une lame de microscope afin d'avoir un maximum de 50 000 cellules. La lame a été centrifugée dans un cytospin (Shandon, Pittsburgh, PEN, USA) pendant 6 minutes. Par la suite, les cellules ont été fixées avec une solution de formaldéhyde 3.7% (1/10 volume formaldéhyde 37%+ 9/10 volume PBS) pendant 10 minutes. Les cellules ont été lavées 3 fois pendant 2 minutes avec une solution PBS/Triton X-100 0.1%. Par la suite, elles ont été incubées pendant 10 minutes à température pièce avec de la solution de blocage (200 μ L BSA 10mg/mL+800 μ L PBS/Triton X-100 0.1%). L'étape suivante a consisté à incuber pendant 30 minutes les cellules en présence

d'anticorps de rat anti-HA High Affinity (Roche Applied Sciences) mélangés à la solution de blocage. Le peptide HA (YPYDVPDYA) reconnu par ces anticorps est un marqueur largement utilisé pour faciliter la détection des protéines par immuno-empreinte ou par immunofluorescence. Les cellules ont de nouveau été lavées 3 fois pendant 2 minutes avec la solution PBS/Triton X-100 0.1%. Ensuite, elles ont été incubées avec l'anticorps anti-IgG de rat couplé au fluorochrome Alexa Fluor 555 (coloration rouge)(Molecular Probes). Dans certains cas, c'est l'anticorps anti-IgG de rat couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 qui a été utilisé (coloration verte.)(Molecular Probes) Les cellules ont été lavées 1 fois 2 minutes avec la solution PBS/Triton X-100 0.1%. Une autre incubation de 20 minutes avec un mélange de solution de blocage/DAPI/Phalloïdine (5 μ L Alexa Phalloïdine(Molecular Probes), 2 μ L DAPI(Sigma) dilué 1 :500,193 μ L de la solution de blocage) a été effectué. Les cellules ont été lavées 3 fois 2 minutes avec une solution PBS/Triton X-100 0.1%. Ensuite, un dernier lavage avec de l'eau a été fait. Il a fallu attendre que la lame soit bien sèche avant de recouvrir les cellules traitées avec du Prolong Gold (Molecular Probe). Une lamelle a été déposée sur la lame de microscope avec une pression uniforme afin d'expulser l'air. La lame a été finalement scellée avec du vernis à ongle et observée avec un microscope inversé à fluorescence ECLIPSE TE2000-S (Nikon) au grossissement désiré. Note importante : il est impossible d'utiliser à la fois l'Alexa phalloïdine et l'anticorps anti-IgG de rat couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 parce qu'ils émettent à la même longueur d'onde c'est-à-dire dans le vert du spectre visible.

2.11 Extraction protéique

Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA (935 μ L PBS+10 μ L Nonidet p-40+5 μ L SDS 20%+100 μ L d'un cocktail d'inhibiteur de protéase(Sigma) dans 1 volume de 50 μ L pour 1000 000 cellules. Le culot de cellules centrifugé a été resuspendu dans du tampon RIPA et incubé sur glace pendant 30 minutes. Le tube qui contenait les cellules a été centrifugé à 16 000g (Biofuge Pico) et le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube. Ce dernier contenait les protéines qui ont été dosées par la méthode Bradford. Le tout a été placé à -80°C.

2.12 Dosage par la méthode Bradford

Une solution Bradford contenant le réactif Bio-Rad Protein Assay dilué 5 fois dans l'eau a été utilisée. L'utilisation d'une solution de BSA 1mg/mL a été préparée pour effectuer une courbe standard de 0µg à 20µg. Par la suite, du réactif de Bradford dilué 5 fois a été ajouté à chaque échantillon à doser. Les densités optiques ou absorbance ont été mesurées avec l'Ultrospec II à une longueur d'onde de 595nm. Les concentrations des extraits protéiques ont été déterminées grâce à la courbe étalon du BSA.

2.13 Immuno-empreinte

Cette méthode a consisté à déposer 10µg d'extraits protéiques sur un gel SDS-PAGE de 12%. Les échantillons ont été chauffés 5 minutes à 98°C, refroidis sur glace et centrifugés quelques secondes. Les échantillons ont été séparés selon leur taille par l'application d'un courant électrique au système qui comprenait un tampon de migration (0.1% (p/v) SDS, 25mM Tris et 192 mM glycine). Lorsque le bleu de bromophénol contenu dans les échantillons atteignait le bas du gel, le tamisage moléculaire était terminé. Un standard de poids moléculaire a été placé sur le gel pour servir de marqueur (Kaleidoscope Prestained Standard : BIO-RAD). Ensuite, les protéines contenues dans le gel ont été transférés sur une membrane de PVDF activée (trempé 15 secondes dans du méthanol 100%+2 minutes dans l'eau) par électro-transfert (BIO-RAD) à 4°C pendant 60 minutes dans un tampon de transfert (25mM Tris, 192mM glycine, 20% (v/v) méthanol). La membrane a été replongée dans du méthanol 100% pendant 10 secondes et placée à 37°C pendant 15 minutes. La membrane de PVDF a été bloquée dans une solution nommée 3/3 (3% FishSkin (Sigma)+3%BSA (Fisher)+TTBS(10mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween-20) pendant 60 minutes à température pièce avec agitation. La membrane bloquée a été incubée avec l'anticorps primaire (IgG de chèvre anti-portion N-terminale de GAP-43 (Santa Cruz)) dilué 1/10 000 dans la solution 3/3 pendant toute une nuit à 4°C. La membrane a été lavée 3 fois pendant 5 minutes avec la solution de TTBS et incubée de nouveau avec un anticorps secondaire (anticorps de souris anti IgG de chèvre H+L spécifique couplé à la HRP (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA) dilué 1/10 000 dans la solution 3/3. La membrane a été lavée 3 fois avec la solution de

TTBS. Pour terminer, les protéines qui se trouvaient sur la membrane ont été révélées par chimioluminescence par l'ajout de substrat ECL (Amersham Pharmacia Biotech; Baie-d'urfé, QC, Canada) puis exposé sur une pellicule de film (Kodak X-Omat, AR)

2.14 Amplification PCR

2.14.1 Amplification PCR de MTPG43 et de MTPG-43-1/2 EYFP à partir du vecteur pMTPG-43-EYFP

Les séquences nucléotidiques de MTPG-43 et de 1/2 EYFP-MTPG-43 ont été amplifiées par polymérisation en chaîne à partir du plasmide pMTPG-43-EYFP(BD Biosciences ClonTech). Voici les amorces (Sigma) qui ont été utilisées:

MTPG-43 forward → 5'-CGG GTA CCC TCG AGG CCA CCA GCT GTG CTG TAT GAG AAG AACC-3'

MTPG-43 reverse → 5'-CGG AAT TCG ATC TTT TGG TCC TCA TCA TTC TT-3'

GFP cut forward 2 → 5'-CCC GGG TAC CCT CGA GCG CCA CCA ATG CTG TGC TGT ATG AGA-3'

GFP cut reverse 2 → 5'-GTT CGA ATT CAG GGT CCA GCT TGC CGT AGG TGG CAT CGC CCTC

Outre les amorces(10 μ M), les mélanges réactionnels contenaient un tampon d'amplification (Invitrogen) 1 μ M d'un mélange de désoxynucléotides triphosphatés (dNTPs) (Amersham Pharmacia Biotech), 1 unité de l'enzyme Taq (GIBCO/BRL) et de l'ADN (1 μ g/ μ L). Pour atteindre un volume final de 50 μ L, de l'eau a été ajoutée aux mélanges. L'amplification a été effectuée à l'aide d'un Mastercycler Gradient 5331 (Eppendorf, Hamburg, Allemagne) selon le programme suivant :

94 °C pendant 2 minutes
94 °C pendant 30 secondes
60 °C pendant 30 secondes
72 °C pendant 45 secondes
72 °C pendant 5 minutes
4 °C jusqu'à la récupération des échantillons



2.14.2 Amplification PCR de MTPG-43 non fusionné à un marqueur à partir du vecteur pcDNA-MT663-MTPG-43-mOrange

La séquence nucléotidique de MTPG-43 a été amplifiée par polymérisation en chaîne à partir du vecteur pcDNA-MT663-MTPG-43-mOrange. Voici les amorces (Sigma) qui ont été utilisées:

MTPG-43 plain F → 5'-CCC AAG CTT CTC GAG GCC ACC ATG CTGTG-3'

MTPG-43 plain R → 5'-GGG ATC CTT AGA ATT CAG GGT CGA TCT TT-3'

Le même type de mélange réactionnel a été effectué comme à la section 2.14.1 avec le même appareil selon le programme suivant:

94 °C pendant 2 minutes
94 °C pendant 30 secondes
55 °C pendant 30 secondes
72 °C pendant 45 secondes
72 °C pendant 5 minutes
4 °C jusqu'à la récupération des échantillons



2.14.3 Mutagenèse dirigée par amplification PCR du peptide MTPG-43 à partir du vecteur ptag-MTPG-43-mOrange

Afin de parvenir à utiliser des versions mutées du peptide, la trousse Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB) a été utilisée. Cette trousse a permis de convertir certains nucléotides de la séquence sauvage du peptide MTPG-43 par d'autres en utilisant le vecteur pTag-MTPG-43-mOrange et des amorces contenant la ou les mutations ponctuelles désirées. Lors de la traduction, la séquence en acides amines est modifiée. Voici les amorces (Integrated DNA Technologies Inc, Coralville, IA) qui ont été utilisées :

Constant → 5'-CTCGAGAAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGA-3'

MGCVM → 5'-GCCACCATCGGCTGCGTGATGAGAAGAA-3'

MGCCM → 5'-GCCACCATGGGCTGCTGTATGAGAAGAA-3'

MLCLM → 5'-GCCACCATGCTGTGCCTGATGAGAAGAA

MLLLM → 5'-GCCACCATGCTGCTGCTGATGAGAAGAA-3'

MLLCM → 5'-GCCACCATGCTGCTGTGTATGAGAA-3'

MGCKVL → 5'-GCCACCATGCTCTGCTGTAAGGTTCTGACCAA

MGLLM → 5'-GCCACCATGGGCCTGCTGATGAGCAGAACCAAACAGGTTGAA-3'

Il est important de noter que l'amorce Constant a été utilisée dans tous les mélanges réactionnels et que seule la seconde amorce changeait selon les cas. Pour chaque mélange, le tampon d'amplification Phusion HF buffer a été utilisé à une concentration finale de 1X. Chaque amorce a été ajoutée à une concentration finale de 0.5µM et les dNTPs à une concentration finale de 200 µM. Une quantité égale à 10pg du vecteur a été placé dans le

mélange et la concentration finale de l'enzyme Phusion Hot Start DNA Polymerase était de 0.02U/ μ L. Le tout a été complété avec de l'eau pour obtenir un volume final de 50 μ L. Voici le programme PCR appliqué aux mélanges réactionnels :

98°C pendant 30 secondes	
98°C pendant 8 secondes	} 25 cycles
67°C pendant 25 secondes	
72°C pendant 2 minutes et 40secondes	
72°C pendant 8minutes	
4°C jusqu'à la récupération des échantillons	

Les plasmides obtenus étaient sous forme linéaire. Ils ont dû être circularisés avec la ligase du phage T4 et transfectés dans les bactéries DH5 α .

2.15 Transfection des cellules K562 et M07e par électroporation

5×10^6 de cellules K562 et M07e ont été centrifugées à 500g (GS-6 Beckman Coulter, Mississauga, ONT, Canada) et lavées une fois avec du PBS-glucose (145mM NaCl, 10 mM phosphate, 8g/L glucose). Les cellules K562 ont été resuspendues dans 400 μ L de milieu IMDM sans sérum et les cellules M07e resuspendues dans 400 μ L de PBS-glucose. Les vecteurs utilisés selon les cas (20 μ g) ont été linéarisés *FspI*, précipités à l'éthanol et remis en suspension dans 400 μ L de milieu IMDM sans sérum pour les cellules K562 et 400 μ L de PBS-glucose pour les cellules M07e. Ensuite, le mélange cellules/vecteur a été placé sur glace pendant 10 minutes avant d'être utilisé. Dans une cuvette de 0.4mm (Invitrogen), le mélange cellules/vecteur y a été inséré et électroporé selon les paramètres suivants : K562, 0.33Kv, 500 μ F et $\infty \Omega$ et M07e 0.7KV, 250 μ F et 200 Ω . Les cellules électroporées ont été placées du milieu IMDM supplémenté de 10%FBS (+10 μ g/mL IL-3 pour cellules M07e). 24 heures plus tard, un compte cellulaire a été fait. Les cellules ont été diluées à 100 000 cellules/mL dans le milieu de culture décrit ci-dessus supplémenté de 250 μ g/mL de l'antibiotique hygromycine B et ensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 10 000 cellules par puits. Les plaques ont par la suite été

incubées à 37°C sous une atmosphère contrôlée de 10% CO₂ jusqu'à l'apparition de microcolonies.

2.16 Transfection des cellules K562, HEK 293, COS-7 et QBI-293A à la LIPOFECTAMINEtm

Ce type de transfection utilise des liposomes afin de permettre au matériel génétique voulu de pénétrer à l'intérieur des cellules hôtes. Pour les cellules en suspension (K562), environ un million de cellules ont été prélevées tandis que pour les cellules adhérentes (HEK 293, COS-7 et QBI-293A), une confluence cellulaire d'environ 70-80% a été nécessaire. Ces cellules ont été cultivées dans une plaque 6 à puits à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 10% CO₂. Pour chaque transfection, il a fallu préparer la solution A (1µg d'ADN + 100µL de solution OPTI-MEM®) et la solution B (6-8µL de LIPOFECTAMINE (Invitrogen) + 100µL de milieu IMDM pour les cellules K562 ou du milieu DMEM pour les cellules HEK 293, COS-7 et QBI-293A). Ensuite, les deux solutions ont été doucement mélangées à la température pièce pendant 30 minutes. Les cellules ont été préalablement lavées 2 fois avec du PBS-glucose. Au mélange des solutions A et B, 0.8ml de milieu de culture respectif aux cellules utilisées a été ajouté. Le tout a été mélangé à nouveau et déposé sur les cellules en culture prête à être transfectées. Par la suite, celles-ci ont été incubées pendant 5 heures à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 10% CO₂. Après ce temps, du milieu de culture supplémenté de 10% FBS frais a été ajouté aux cellules traitées. 24 à 72 heures post-transfection, les résultats ont été observés au microscope au grossissement désiré.

2.17 Infection des CSHs par le vecteur d'expression adénoviral

2.17.1 Construction adénovirale

La séquence nucléotidique de MTPG-43 non fusionné à un marqueur a été insérée dans le vecteur pAdTrack-MT+ selon le clonage directionnel *HindIII/BamHI*. Suite à l'amplification et à la purification du vecteur recombinant, celui-ci a été linéarisé *PacI* et introduit par électroporation (2.5KV, 200 Ω et 25 μ F, cuvette de 2mm (Invitrogen) dans des bactéries BJ5183 électrocompétentes (Qbiogen). Ces dernières contenaient déjà le plasmide pAdEasy-1/F35 (squelette nucléotidique de l'adénovirus) nécessaire à la recombinaison homologue du vecteur pAdTrack-MT+. Les bactéries transfectées ont été sélectionnées grâce à l'ajout de kanamycine (0.8%(p/v)) dans le milieu solide LB. Ensuite, l'ADN du virus a été amplifié par culture bactérienne, purifié et vérifié par digestion enzymatique *PacI*.

2.17.2 Production et purification de virus recombinants à partir des cellules QBI-293A

Les cellules QBI-293A ont été nécessaires pour permettre la production de virus. Celles-ci contiennent les gènes de réplication de l'adénovirus qui sont absents du squelette nucléotidique adénovirale utilisé précédemment. Une fois vérifié par digestion, l'ADN du virus recombinant a été linéarisé *PacI*, précipité à l'éthanol et introduit dans les cellules QBI-293A par transfection à la LIPOFECTAMINE tel que décrit à la section 2.16. en utilisant du milieu de culture DMEM. Les cellules ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 10% CO₂. L'infection complète des cellules (environ 90-100%) a été achevée après quelques jours de culture. La présence de cellules décollées et fluorescentes au microscope attestait de la production d'adénovirus. La récupération des particules virales a pu être effectuée à ce moment. Pour ce faire, 3 cycles de gel/dégel ont été nécessaires afin de lyser les cellules et de permettre au virions de s'échapper du contenu intracellulaire. Le surnageant a été récupéré et appliqué à une colonne de purification Adeno-XTM virus Mini purification Kit (ClonTech) selon les recommandations du fabricant. Le titrage de l'infectivité virale a été effectué selon la méthode DICT50 (50% de doses

infectieuses sur cultures de tissus par millilitre). La formule suivante permet de calculer la concentration du nombre de particules infectieuse (IFU) purifiées par mL :

IFU/mL= (nombre de cellules par champs optique x 293 cellules/puits) / (0.05mL x facteur de dilution)

2.17.3 Procédure d'infection

Les CSHs ont été cultivées dans du milieu BS1[113] composé de milieu IMDM sans sérum (Gibco BRL), 20% BIT (Stem Cell Technologies) 40µg/mL de lipoprotéines de basses densités (Sigma), 5×10^{-2} 2-mercaptoethanol (Sigma) supplémenté d'un cocktail de cytokines (30ng/mL TPO, 1ng/mL SCF, 7.5ng/mL IL-6, 13.5 ng/mL IL-9 (R&D Systems) à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 10% CO₂ dès les premiers instants suivant leur décongélation L'infection a été faite au jour 8 de la culture suite à un compte de viabilité cellulaire. Les cellules ont été centrifugées à 500g (GS-6 Beckman Coulter, Mississauga, ONT, Canada) et transférées dans des tubes Eppendorfs de 1.5 mL à raison de 1000 000 cellules/mL. Les adénovirus recombinants ont été incorporés aux cellules selon la dose infectieuse désirée. Le mélange cellules/virus a été placé sur un OrbitalShaker(Cole-Palmer, USA) pendant 45 minutes à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 10% CO₂ afin de faciliter l'adhésion des virus aux cellules. Celles-ci ont par la suite été transférées dans une plaque de 24 puits et diluées à une densité cellulaire finale de 100 000 cellules/mL avec du milieu BS1.

2.18 Les vecteurs recombinants

Tout d'abord, suite aux amplifications PCR, les amplicons MTPG-43 et ½ EYFP-MTPG-43 ont été insérés dans le vecteur p.HA.CE selon le clonage directionnel *KpnI* et *EcoRI*. Cette manipulation a permis aux amplicons d'être juxtaposés au marqueur HA (YPYDVPDYA) ou mOrange. En digérant *XhoI* les constructions obtenues dans pHA.CE ou ptag-mOrange, il a été possible de conserver les inserts maintenant fusionnés aux marqueurs et de les introduire dans le vecteur pcDNA-MT663. Les digestions *NotI* et *EcoRI* ont été nécessaires afin de déterminer l'orientation des inserts.

2.19 Traitements aux produits chimiques

Les produits tels que la Brefeldin A (Sigma) le 2-bromo-palmitate (Fluka) et le SU6656 (Sigma) ont été reconstitués et utilisés selon les recommandations des fabricants. Les concentrations finales utilisées ont variées selon les données présentes dans la littérature. Avant d'utiliser les cellules, celles-ci ont fait l'objet d'un compte de viabilité cellulaire. La densité cellulaire finale a été de 100 000 cellules/mL pour chaque concentration de produits chimiques déterminées.

2.20 Colorations avec le BODIPY TR C5 ceramide et le Hoechst 33343

Le BODIPY TR C5 ceramide (Molecular Probes) et le Hoechst 33343(Sigma) ont été reconstitués et utilisés selon les recommandations des fabricants. Les concentrations ont pu varier entre les expériences. La concentration de BODIPY utilisée a été de 0.1mg/mL pour colorer 200 000 cellules et 0.04mg/mL de Hoechst 33343 pour colorer l'ADN de 200 000 cellules. À noter qu'une incubation à 37°C pendant 20 minutes a été effectuée et ce, pour les deux produits. Les cellules viables ont été ensuite observées à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence ECLIPSE TE2000-S (Nikon)

3 Résultats

3.1 L'expression exogène de la protéine membranaire MTPG-43-EYFP dans un modèle d'étude apparenté aux MCs provoque un phénotype de gigantisme cellulaire

L'investigation de la formation du sillon de clivage lors de la mégacaryopoïèse a reposé sur deux éléments centraux. Premièrement, la lignée cellulaire utilisée comme modèle se devait de présenter certaines caractéristiques propres aux MCs pour ainsi refléter le plus fidèlement possible la réalité liée à l'organisation structurale de ce type de cellules spécialisées. Deuxièmement, l'outil moléculaire se devait d'être reconnu capable de cibler la membrane cytoplasmique et, plus particulièrement, les phosphoinositides membranaires qui sont requis pour mener à terme la division cellulaire[96-103]. De cette façon, la véracité des observations recueillies a été d'une plus grande justesse pour vérifier l'hypothèse posée initialement.

La lignée mégacaryocytaire humaine M07e a été désignée comme le modèle d'étude biologique pour débiter l'expérimentation. Les cellules M07e sont bloquées irréversiblement à un stade tardif de la différenciation mégacaryocytaire. Elles partagent étroitement des traits communs avec les MCs retrouvés *in vivo*[104]. Malgré son temps de génération contraignant (~36 heures), cette lignée cellulaire cytokine-dépendante est normalement maintenue sans difficulté [105].

L'outil moléculaire désigné pour la réalisation de cette étude a été la protéine MTPG-43-EYFP. Sa capacité à lier la membrane cytoplasmique et à émettre de la fluorescence a justifié son choix car la formation du sillon de clivage lors de la mitose est la conséquence du repliement des membranes cellulaires sur elles-mêmes[92,93]. Insérée dans un plasmide commercial (pMTPG-43-EYFP), la séquence nucléotidique de la protéine est sous le contrôle du promoteur CMV. Cette construction plasmidique possède également tous les facteurs génétiques nécessaires à l'expression de la protéine MTPG-43-EYFP dans des cellules de mammifères (gène de résistance, origine de réplication, séquence consensus Kozak etc.)[127].

Afin de permettre la production endogène de la protéine membranaire et fluorescente dans les cellules M07e, quelques microgrammes (~20µg) du plasmide commercial ont été mélangés à 5 millions de cellules en phase exponentielle de croissance. Le tout a par la suite été électroporé selon des paramètres prédéfinis (voir la section 2.15)

Les cellules M07e qui ont réussi à incorporer le plasmide et qui ont été sélectionnées sur la base de leur résistance à l'antibiotique et de leur fluorescence ont tenté d'être maintenues en culture. Le verbe tenter est le terme exact à employer dans ce cas bien précis. En effet, les clones ont été difficiles à cultiver parce que ceux-ci ont semblé être éprouvés par l'électroporation et par l'expression de la protéine MTPG-43-EYFP. L'intégrité des membranes cytoplasmiques a probablement été altérée parce que de nombreux débris cellulaires hétérogènes ont été observés et le contenu intracellulaire des cellules transformées semble s'être déversé dans le milieu de culture (figure 3.1). La faible prolifération et la faible viabilité cellulaire des clones ont été supposément causées par l'expression de l'outil moléculaire.

Toutefois, avant de se désagréger, les cellules M07e transformées ont pris de l'expansion, c'est-à-dire qu'elles ont considérablement augmenté de volume. Leur diamètre cellulaire moyen a été de 3 fois supérieur à celui de leurs homologues transfectés avec un vecteur contrôle. Le gigantisme cellulaire observé a rappelé le phénotype du MC au terme de son programme de différenciation[69].

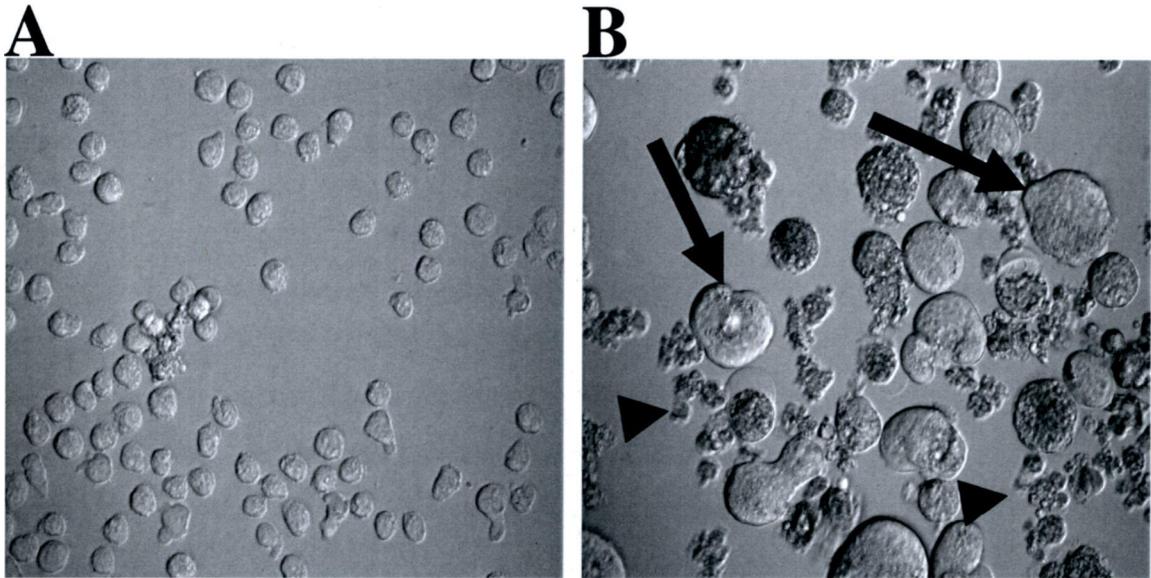


Figure 3.1 : Les cellules mégacaryocytaires M07e qui expriment la protéine MTPG-43-EYFP affichent un phénotype de gigantisme cellulaire. A) culture de cellules M07e, B) cellules M07e transfectées avec le plasmide pMTPG-43-EYFP. Ces cellules ont subi une modification de leur morphologie cellulaire. Les flèches indiquent la présence de cellules aux allures boursoufflées. De nombreux débris cellulaires sont également présents (représentés par des têtes de flèche). Le nombre d'expériences réalisées est de 3. Le grossissement est de 400X.

3.2 Identification de l'élément responsable du gigantisme cellulaire provoqué par la protéine chimérique MTPG-43-EYFP

Suite aux résultats préliminaires obtenus avec la lignée de cellules M07e tel que décrit à la section précédente, la ligne directrice du projet de recherche a visé à déterminer l'élément central responsable du phénotype observé. En d'autres mots, il a été impératif de vérifier si le gigantisme cellulaire provoqué est attribuable à l'expression de la protéine chimérique MTPG-43-EYFP ou à une portion bien précise de celle-ci. La protéine fluorescente EYFP a été abondamment utilisée dans des myriades de travaux de recherche sans provoquer d'effets aussi spectaculaires que ceux illustrés à la figure 3.1. On ne peut toutefois exclure définitivement sa participation[128]. En effet, la structure cylindrique de cette protéine fluorescente se compare avec une famille de protéines nommées porines. Présentes à la surface des membranes cytoplasmiques des bactéries et aux membranes

nucléaires des eucaryotes, les porines favorisent le transport de certaines molécules grâce à leur structure en forme de tunnel[106]. Étant donné qu'il est peu probable que EYFP puisse agir de la sorte, les soupçons ont été redirigés avec raison vers MTPG-43.

La stratégie préconisée pour identifier l'agent responsable a été de décortiquer la protéine chimérique MTPG-43-EYFP. Comme l'indique le tableau 2, quelques versions modifiées de la protéine d'origine ont été projetées de construire afin de réduire volontairement la taille de la protéine MTPG-43-EYFP ou encore de changer la nature du marqueur fusionné à MTPG-43. De cette façon, plusieurs possibilités auront été explorées et la cause du gigantisme cellulaire pourra finalement être isolée.

Tableau 2: Illustrations des différentes versions de protéines chimériques testées

		LÉGENDE
MTPG-43-EYFP		 → MTPG-43
MTPG-43 -1/2 EYFP		 → EYFP  → 1/2 EYFP
MTPG-43		 → HA
MTPG-43-mORANGE		 → mORANGE

Tout d'abord, la protéine fluorescente EYFP a été résolument scindée et fusionnée au peptide MTPG-43 pour générer la protéine MTPG-43-1/2EYFP non fonctionnelle. Le peptide HA (YPYDVPDYA) a été introduit dans cette construction étant donné la perte de fluorescence attribuée à une EYFP tronquée. Ce marqueur est largement

utilisé pour faciliter la détection des protéines par immuno-empreinte ou par immunofluorescence[107]. Toujours selon l'idée de départ, le peptide MTPG-43 a été davantage isolé lors de la réalisation d'une deuxième protéine chimérique. En effet, seul le marqueur HA y a été attaché ce qui exclut complètement maintenant la présence de EYFP. Finalement, une autre protéine fluorescente, mOrange, a remplacé EYFP et le marqueur HA dans une troisième construction. Au total, 4 protéines chimériques différentes (incluant MTPG-43-EYFP d'origine) en plus d'une construction contrôle ont été projetées d'utiliser pour valider l'implication du peptide MTPG-43. Le tableau 3 met en évidence les caractéristiques importantes qui sont associées à chacune d'entre elles. La constante fondamentale à retenir est que le peptide MTPG-43 se retrouve toujours en position N-terminale et ce peu importe les constructions réalisées.

Tableau 3: Caractéristiques des versions de protéines chimériques testées

Nom de la protéine exprimée	Caractéristiques de la protéine exprimée	Nombre d'acides aminés*	Nature du marqueur fusionné	Poids moléculaire (kDa)*
MTPG-43-EYFP	EYFP fonctionnelle dirigée à la membrane	260	EYFP	31
MTPG-43-½ EYFP-	EYFP non fonctionnelle dirigée à la membrane	76	HA	8.5
MTPG-43	Peptide dirigé à la membrane	33	HA	4.0
MTPG-43-mOrange	Peptide MTPG-43 dirigé à la membrane	251	mOrange	30

Le nombre d'acides aminés et le poids moléculaire attendu incluent les marqueurs

3.3 Construction des plasmides exprimant les protéines chimériques

Pour parvenir à générer les différentes protéines chimériques, les amplifications PCR ont permis de manipuler la séquence nucléotidique de la protéine membranaire à partir

du plasmide pMTPG-43-EYFP. Les amorces utilisées sont indiquées à la section 2.14.1. Les délétions générées ont permis de décortiquer la protéine MTPG-43-EYFP afin de déterminer la portion protéique responsable du gigantisme cellulaire observé. La taille des amplicons obtenus pour MTPG-43-½ EYFP et MTPG-43 a été respectivement de 250 pb et de 100 pb et correspondent aux tailles attendues comme le démontre la figure 3.3.

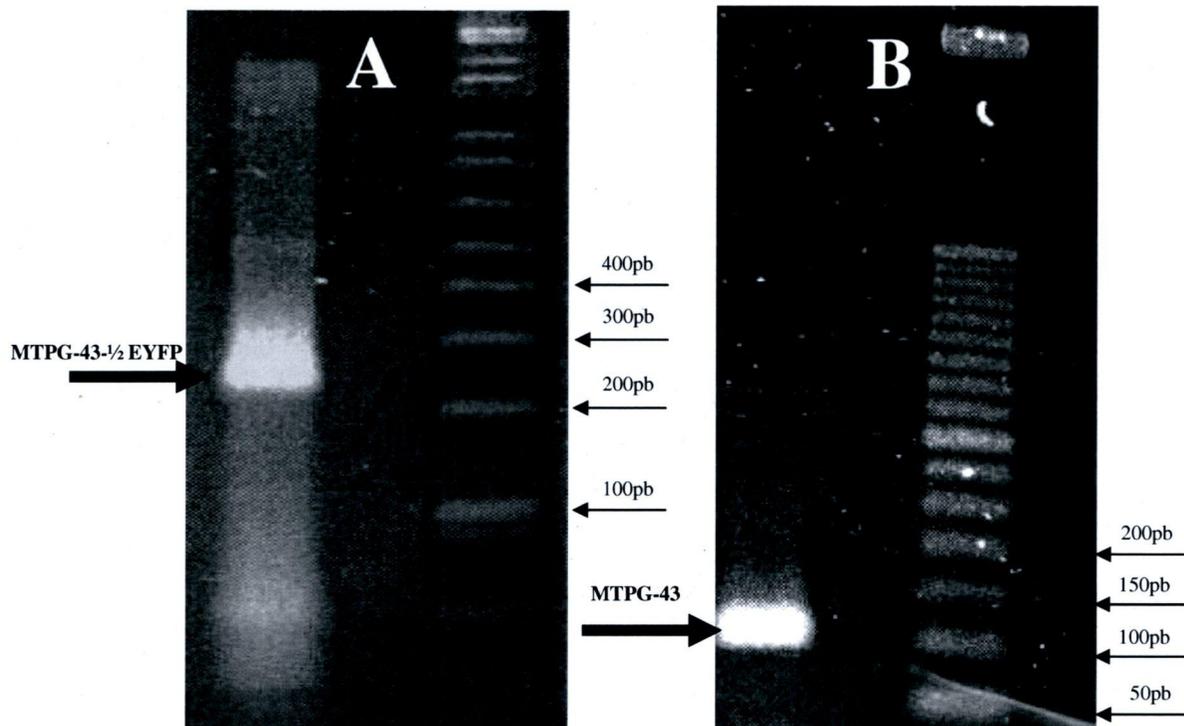


Figure 3.3 : Des réactions PCR ont généré les amplicons MTPG-43-½ EYFP et MTPG-43: Photographies de gels d'agarose colorés avec du SYBR Gold révélant les résultats d'amplification au PCR des cDNA codant pour les transgènes suivants : A) MTPG-43-½ EYFP (250pb) B) MTPG-43 (100pb). Ces deux amplicons ont servi de base pour construire les protéines chimériques

Les amplicons ont été par la suite purifiés et séquencés afin de s'assurer de la qualité du matériel génétique. Les séquences nucléotidiques de MTPG-43-½ EYFP et MTPG-43 ont été insérées dans le plasmide pHA.CE par clonage directionnel afin de juxtaposer le marqueur HA en position C-terminale des protéines qui nécessitent ce dernier. L'amplicon MTPG-43 a également été introduit dans le plasmide ptag-mOrange pour lui permettre d'être fusionné au marqueur fluorescent mOrange. Ce plasmide est une version modifiée du vecteur pHA.CE. La seule modification apportée à ce plasmide a été de

substituer la séquence nucléotidique du marqueur HA par celle correspondant à mOrange. Cette substitution a été réalisée par Carl Simard, un des membres de l'équipe du Dr Serge Côté.

3.4 Le promoteur MT663 et la lignée cellulaire K562 ont été désignés pour poursuivre l'étude sur le phénotype de gigantisme cellulaire

Étant donné que la quantité de protéines nécessaire pour déclencher le phénotype de gigantisme cellulaire sans diminuer la viabilité n'était pas connue, l'utilisation d'un promoteur permettant la modulation des transgènes a été considérée pour déterminer le seuil de d'expression idéale. Le promoteur MT663 (inclus dans le plasmide pcDNA-MT663) offre cet avantage et c'est pourquoi il a été choisi. En effet, ce vecteur a la capacité d'accentuer la production de protéines via l'activité de son promoteur du gène métallothionéine I murin inductible au zinc[108]. Contrairement au promoteur CMV, qui favorise constamment et abondamment la transcription génétique, l'activité du promoteur MT663 est inductible. Placé dans des conditions permissives, ce promoteur peut augmenter la transcription d'ARNm au moment voulu ce qui peut se traduire par une quantité accrue de protéines produites. À l'opposé, l'absence d'inducteur empêche l'expression génétique. Le promoteur MT663 offre donc une gamme de production protéique.

La lignée cellulaire K562 a été désignée comme le modèle d'étude alternatif aux cellules M07e. Pour justifier ce choix, il faut mentionner que les cellules K562 ont un temps de génération oscillant entre 18 et 22 heures comparativement à environ 36 heures pour les cellules M07e[105] ce qui facilite et accélère la sélection clonale. De plus, la lignée cellulaire K562 résiste davantage à l'électroporation que les cellules M07e. Cependant, il est important d'ajouter que la résistance à l'électroporation dépend avant tout des paramètres électriques employés. La lignée K562 est située à l'embranchement de la différenciation érythrocytaire et mégacaryocytaire. Elle possède elle aussi des traits communs avec les MCs ce qui justifie son utilisation[129].

Des clones exprimant les protéines chimériques ont été créés à partir des cellules K562 grâce à l'incorporation par électroporation des plasmides pcDNA-MT663 contenant les différentes séquences nucléotidiques des transgènes à l'étude. Environ 15 à 20 jours ont

été nécessaires pour obtenir des colonies résistantes à l'hygromycine B, faculté conférée par la présence d'un gène de résistance à cet antibiotique inclus dans le vecteur pcDNA-MT663.

3.4.1 L'inductibilité du promoteur MT663 dans les cellules K562 transformées est négligeable.

Suite à la sélection et à l'expansion clonale, des tests d'inductibilités ont été effectués. Du sulfate de zinc ($ZnSO_4$) a été ajouté dans le milieu de culture des cellules K562 transformées à diverses concentrations pour tenter de trouver la dose idéale à employer. Cependant, les variations attendues ne se sont pas manifestées. En effet, l'expression des protéines chimériques a été relativement constante et ce peu importe les concentrations d'inducteur utilisées, en raison d'une expression constitutive de base des transgènes. Par exemple, la figure 3.4 démontre que le clone MTPG-43-EYFP exprime une intensité de fluorescence de base non négligeable en absence d'induction lorsque comparée à celle résultante à l'ajout de zinc.

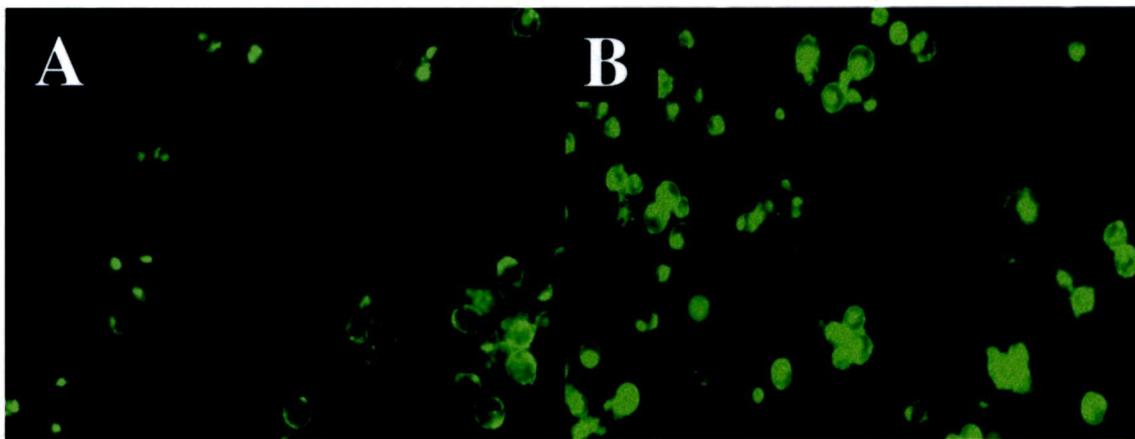


Figure 3.4.1 Une expression constitutive de base des transgènes est détectée en absence d'induction A) Clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP non induit, B) Clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP induit avec $100\mu M$ de sulfate de zinc ($ZnSO_4$). Les concentrations intermédiaires ($25\mu M$, $50\mu M$) ont eu des effets similaires à la concentration maximale utilisée (non montré). Le grossissement est de 200x.

3.5 Détection des protéines chimériques

À la section précédente, l'une des méthodes de détection préconisées a été introduite. En effet, la microscopie à fluorescence a permis d'observer les protéines chimériques telles que MTPG-43-EYFP et MTPG-43-mOrange. Les deux protéines chimériques ont été détectées à la membrane cytoplasmique. De plus, une accumulation ponctuelle importante de protéines fluorescentes dans chaque cellule a également été décelée. La figure 3.5.1 souligne l'observation pour les clones K562-MT663-MTPG-43-EYFP et K562-MT663-MTPG-43-mOrange .

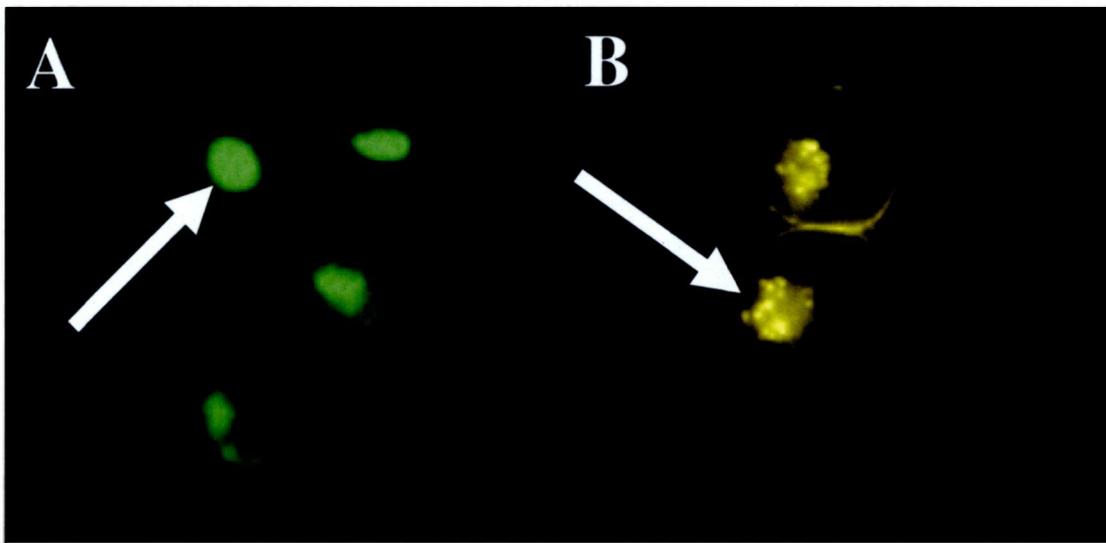


Figure 3.5.1: Les protéines chimériques fluorescentes sont détectées aux membranes cytoplasmiques et dans un autre compartiment cellulaire a) clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP b) clone K562-MT663-MTPG-43-mOrange. Les deux protéines ont été détectées au niveau des membranes cellulaires. Une accumulation ponctuelle majeure de protéines a également été détectée dans une région définie des cellules transformées (indiqué par les flèches blanches). Le grossissement est de 400X.

En ce qui concerne la détection des protéines MTPG-43- $\frac{1}{2}$ EYFP et MTPG-43, une stratégie différente a dû être employée étant donné l'absence de peptide fluorescent fusionné à celles-ci. Suite à une extraction protéique pratiquée sur 5 millions de cellules par clone, les échantillons recueillis ont été tamisés sur gel de polyacrylamide et électrotransférés sur une membrane activée de PVDF. La membrane a été par la suite

incubée en présence d'un anticorps primaire spécifique (IgG anti-MTPG-43) et par la suite avec un anticorps secondaire (anticorps anti IgG) couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase). La membrane traitée a été finalement exposée à une pellicule de film et a révélé la présence des protéines recherchées au poids moléculaires attendus. En effet, les bandes détectées par le processus de chemiluminescence correspondent aux tailles des protéines MTPG-43 (4 kDa) et MTPG-43- $\frac{1}{2}$ EYFP (8.5 kDa) attendues.

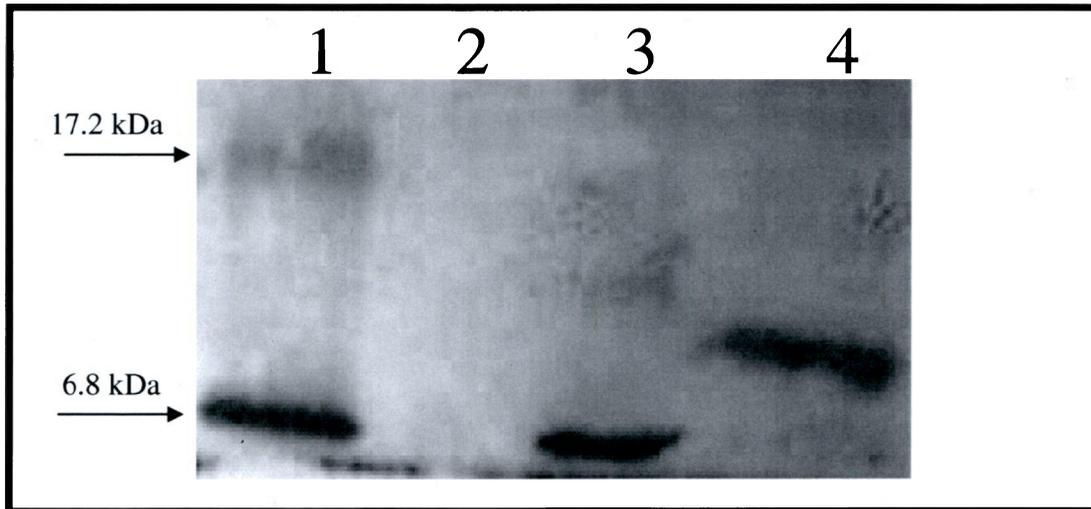


Figure 3.5.2. Les protéines chimériques non fluorescentes possèdent les poids moléculaires attendus tel que révélé par immuno-empreinte Puits 1, marqueur de poids moléculaire (kDa) Kaléidoscope, Puits 2, extrait protéique de cellules K562 contrôles non transfectées (5 μ g), Puits 3, extrait protéique du clone K562-MT663-MTPG-43 (5 μ g), Puits 4, extrait protéique du clone K562-MT663-MTPG-43- $\frac{1}{2}$ EYFP (5 μ g). Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) en condition dénaturante et électrotransfert sur membrane PVDF, cette dernière a été mis en contact avec un premier anticorps ciblant MTPG-43 et un anticorps secondaire couplé à la HRP qui reconnaît l'anticorps primaire. La bande située au bas du puits 3 correspond à la protéine MTPG-43 (4.0 kDa) et celle située dans le puits 4 correspond à MTPG-43- $\frac{1}{2}$ EYFP (8.5 kDa). Ce résultat a été obtenu avec l'aide de Jean-François Joset-Lauzon, étudiant stagiaire lors de l'été 2006.

D'autre part, les protéines chimériques non fluorescentes ont pu être visualisées intégralement avec certaines autres structures cellulaires par la méthode de l'immunofluorescence. Celle-ci offre la possibilité de détecter les protéines et de les situer spatialement. En effet, suite à la fixation chimique des clones à la formaldéhyde et à l'ajout de produits colorants en vue de la préparation des échantillons, les images qui en résultent donnent une perspective d'ensemble des structures cellulaires. À la figure 3.5.3, trois

couleurs différentes ont été utilisées. Le colorant DAPI a permis de mettre en évidence l'ADN (figure 3.5.3). Certaines cellules ont présenté des noyaux polylobés ce qui signifie qu'elles étaient polyploïdes. Par contre, la majorité des cellules n'ont pas présenté cette caractéristique. Le colorant phalloïdine a mis en évidence le cytosquelette d'actine (figure 3.5.3). Les filaments d'actine ont semblé être séquestrés dans quelques cellules témoignant peut-être ainsi d'une activité visant à restructurer la structure du cytosquelette d'actine. L'anticorps anti MTPG-43 couplé au fluorochrome Alexa Fluor 555 a mis l'emphase sur la protéine chimérique MTPG-43 (en rouge, figure 3.5.3). Dans ce cas ci, la plupart des cellules fixées ont encore une fois arboré une forte accumulation du peptide à un endroit cellulaire indéterminé jusqu'à maintenant.

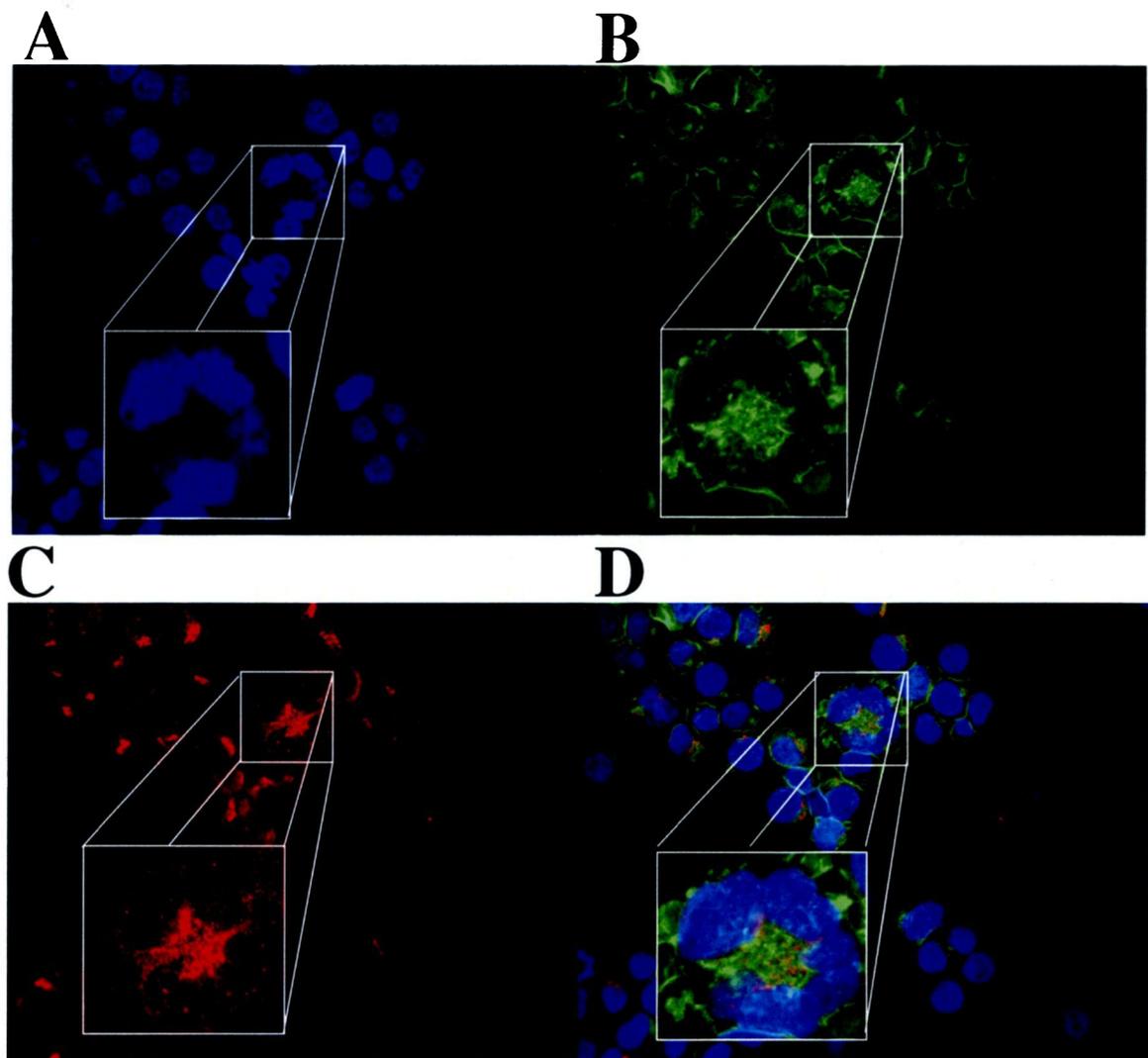


Figure 3.5.3 Le peptide MTPG-43 s'accumule dans une région cellulaire indéterminée du clone K562-MT663-MTPG-43. a) L'ADN de chaque cellule apparaît en bleu suite à l'ajout du colorant DAPI, b) le cytosquelette d'actine de chaque cellule apparaît en vert suite à l'ajout du colorant phalloïdine, c) MTPG-43 est apparu en rouge suite à l'ajout d'anticorps primaires et secondaire (marqué d'un fluorochrome Alexa Fluor 555), d) superposition des trois photos a, b et c. Ces photos sont représentatives de tous les clones utilisés qui ont exprimé le peptide MTPG-43 fusionné ou non à différents marqueurs. Le grossissement est de 400X.

3.6 Localisation intracellulaire du peptide MTPG-43

3.6.1 Le peptide MTPG-43 s'accumule de façon irrégulière à la membrane cytoplasmique

La capacité de cibler la face interne de la membrane cellulaire a été l'une des caractéristiques rapportées du peptide MTPG-43[97-99,103]. Par la technique de détection par immunofluorescence indirecte décrite succinctement à la section précédente, un agrandissement d'une zone de la membrane cellulaire du clone K562-MT663-MTPG-43 a été effectué. Selon les observations, le peptide (en vert dans ce cas ci à cause du fluorochrome, Alexa 488) s'est dirigé à la membrane cytoplasmique. Par contre, le manque d'uniformité dans la distribution spatiale du peptide MTPG-43 a semblé indiquer qu'il ciblait particulièrement certaines microstructures qui étaient aléatoirement distribuées sur la membrane. Pour donner une meilleure vue d'ensemble, le noyau a été contre coloré au DAPI. Certaines cellules étaient polyploïdes mais elles se trouvaient peu nombreuses. La phalloïdine n'a pas été utilisée dans ce cas bien précis parce que son émission de fluorescence correspond à celle du fluorochrome mentionné ci-dessus. La figure 3.6.1 fait état des observations.

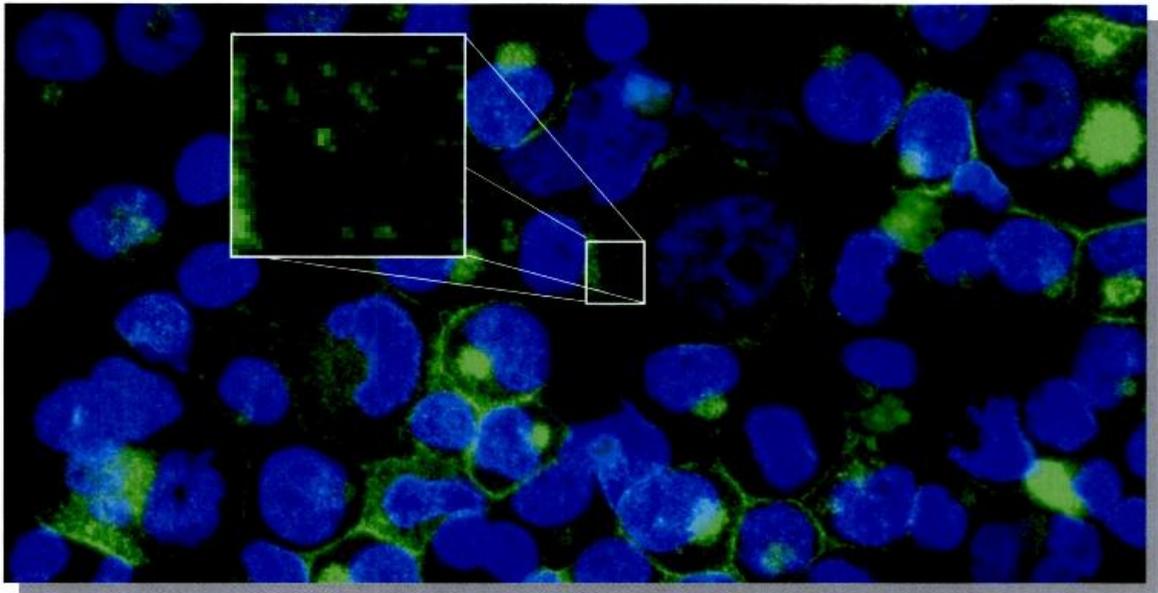


Figure 3.6.1 : La membrane cytoplasmique du clone K562-MT663-MTPG-43 est tapissée irrégulièrement par le peptide MTPG-43. La présente image a été le résultat de la superposition de deux photos. L'ADN est apparu en bleu suite à l'ajout du colorant DAPI. Le peptide MTPG-43 est apparu en vert suite à l'ajout d'anticorps primaires et secondaires (le second étant couplé à un fluorochrome Alexa Fluor 488). Une portion de la membrane cytoplasmique d'une cellule a été agrandie afin de montrer l'irrégularité de la dispersion du peptide. Le grossissement est de 400X.

3.6.2 L'accumulation du peptide MTPG-43 dans les clones de cellules K562-MT663-MTPG-43 semble être localisée au même endroit que le plan de clivage formé lors de la division cellulaire

Suite à la fixation chimique des cellules à la formaldéhyde en vue de la préparation des échantillons pour l'immunofluorescence, il a été possible d'observer les différentes phases du cycle cellulaire. En effet, dans une culture cellulaire, les cellules sont asynchrones ce qui veut dire qu'elles ne sont pas toutes aux mêmes stades du cycle cellulaire. Certaines sont en G1, d'autres en phase S et d'autres en G2/M. Par une

observation attentive des cellules traitées, quelques-unes d'entre elles ont présenté les caractéristiques d'une division cellulaire avancée (environ 40%). À la figure 3.6.2, les noyaux colorés au DAPI (en bleu) ainsi qu'un intense réseau de filaments d'actine colorés à la phalloïdine (en vert) révèlent une cytokinèse inachevée.

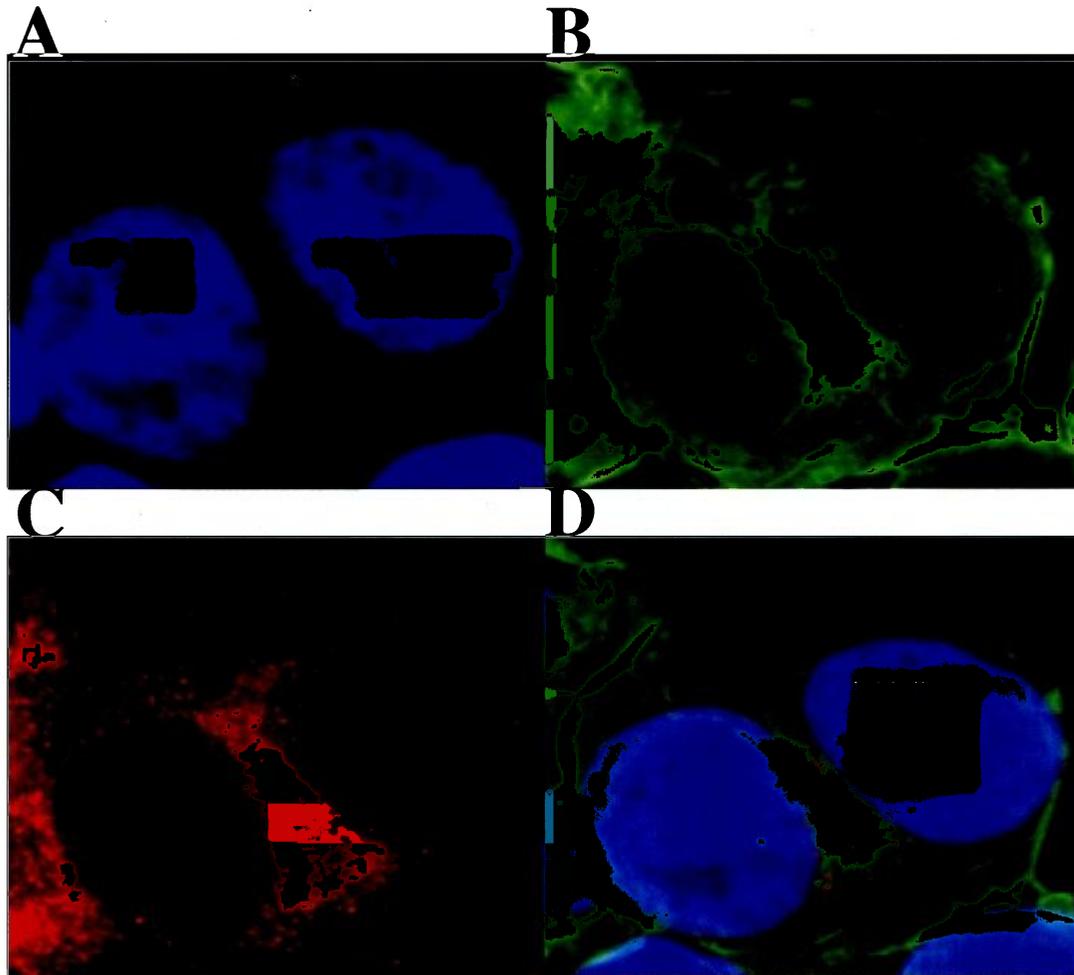


Figure 3.6.2 : Le peptide MTPG-43 et le réseau de filaments d'actine sont présents de façon abondantes au plan de clivage dans les cellules du clone K562-MT663-MTPG-43 au terme de la division cellulaire. A) noyaux d'ADN (bleu), B) cytosquelette d'actine (vert), C) MTPG-43 (rouge), D) superposition des photos A B et C. La séparation physique des deux cellules filles semble avoir échoué possiblement à cause de l'accumulation du peptide MTPG-43 site du repliement des membranes sur elles-mêmes. Le grossissement est de 1000X.

3.6.3 Le peptide MTPG-43 s'accumule également en forte concentration au sein de l'appareil de Golgi

Une particularité du peptide MTPG-43 a été sa capacité à s'agglomérer de façon importante aux membranes mais également dans un compartiment cellulaire précis comme en ont témoigné les observations par microscopie à fluorescence (figures 3.4.1, 3.5.1, 3.5.3, 3.6.1). Le compartiment cellulaire impliqué a été identifié grâce à une coloration avec l'agent BODIPY. Ce colorant est composé de sphingolipides couplé à un fluorochrome[109]. Ajouté au milieu de culture, il colore l'appareil de Golgi au sein de cellules viables. En effet, comme cet organelle est riche en sphingolipides, le composé BODIPY s'y fixe naturellement. L'observation faite par microscopie à fluorescence a révélé que l'accumulation de MTPG-43-EYFP coïncidait avec la localisation de l'appareil de Golgi.

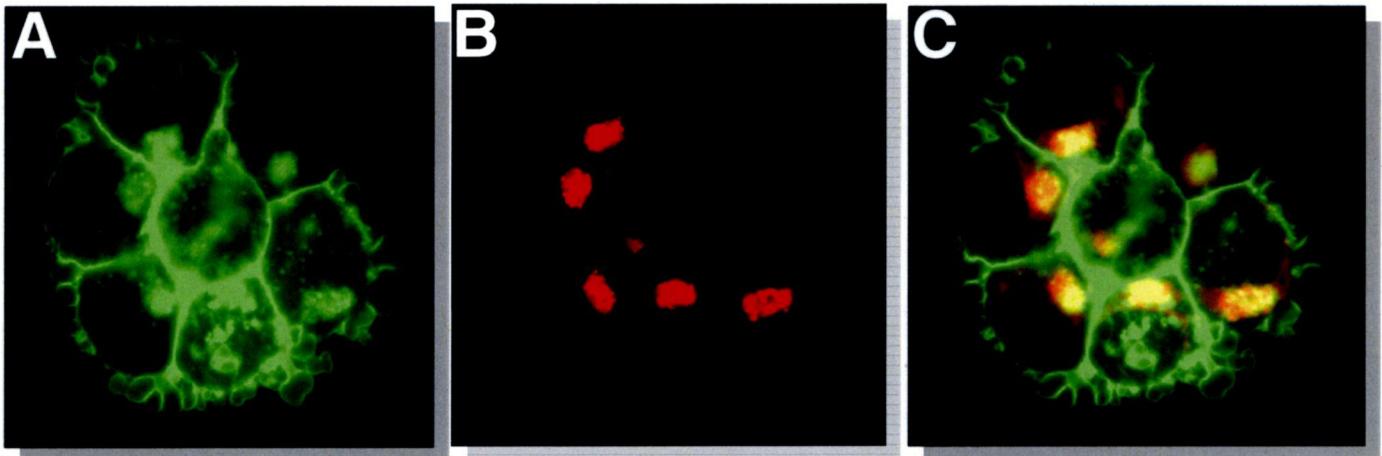


Figure 3.6.3 : La protéine MTPG-43-EYFP est également localisée à l'appareil de Golgi dans les cellules du clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP. Un groupe de sept cellules a été photographié A) MTPG-43-EYFP en vert B) l'appareil de Golgi a été coloré en rouge (BODIPY), C) superposition des photos A et B. Les taches vertes et rouges, lorsque superposées, ont indiqué la forte présence de la protéine fluorescente dans l'appareil Golgi.

3.7 Les cellules K562 exprimant le peptide MTPG-43 augmentent de taille mais n'affichent pas le gigantisme cellulaire observé chez les cellules M07e

Les cellules K562 transformées ont acquises une taille accrue par rapport aux cellules contrôles. Par contre, l'effet des protéines chimériques a semblé moins drastique que chez les cellules M07e (section 3.1.). Suite à l'observation des lignées stables en microscopie à contraste de phases, la majorité des cellules ont augmenté de taille. Le diamètre moyen des clones a été de 2 fois supérieur à celui des cellules contrôles. Certaines cellules transformées sont devenues surdimensionnées mais elles n'ont pas été prédominantes au sein des cultures (figure 3.7.1). L'augmentation du volume cellulaire a été observée chez tous les clones (n=8).

L'effet des protéines chimériques sur les cellules s'est également reflété lors de tests en cytométrie en flux. Les clones ont été analysés par FACS selon le paramètre FSC-H. Celui-ci a fourni des données quantitatives sur leur taille relative. L'augmentation de celle-ci a varié entre 13% et 26% selon les clones étudiés par rapport aux cellules contrôles tel que mis en évidence à la figure 3.7.2. La décortication de la protéine MTPG-43-EYFP a permis d'affirmer que le peptide MTPG-43 a été la cause du phénotype de gigantisme cellulaire. À la lumière des observations, les clones exprimant MTPG-43 associé ou non à EYFP ou mOrange présentent tous le même phénotype de taille accrue.

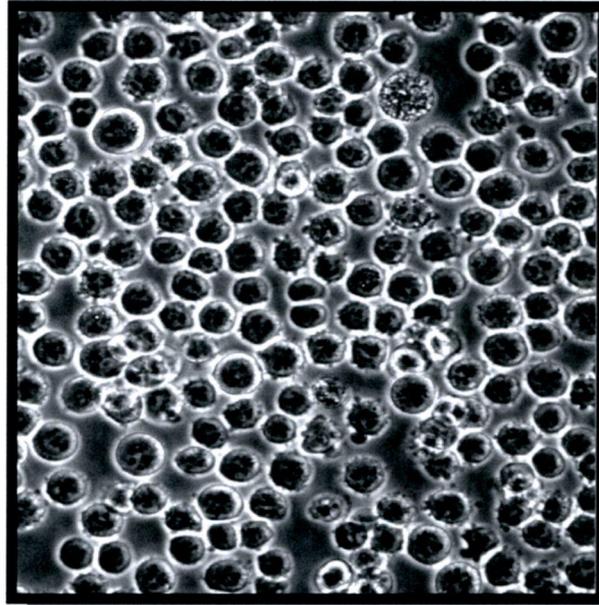
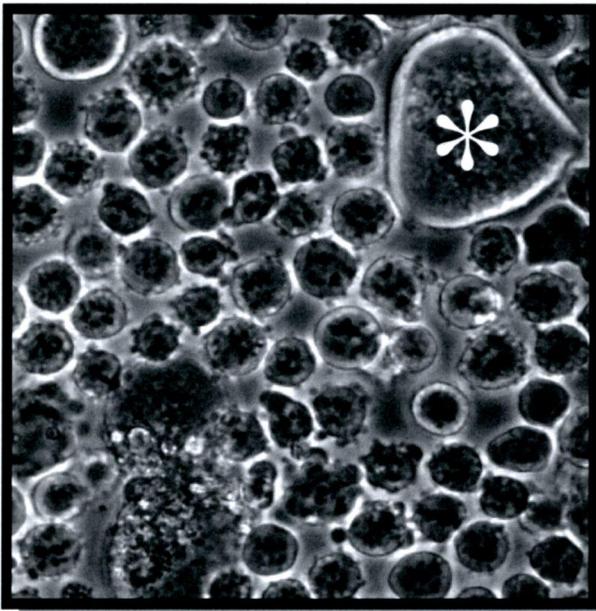
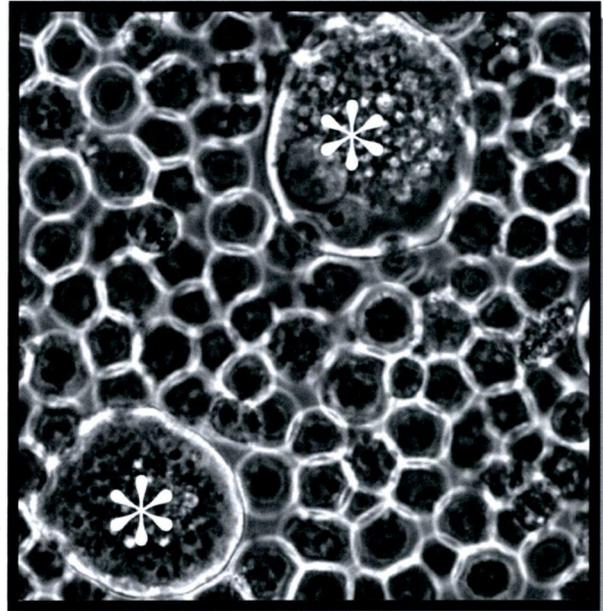
A**B****C**

Figure 3.7.1 : Les clones de cellules K562 augmentent de taille suite à l'expression du peptide MTPG-43. A) Cellules K562 contrôles, B) Clone K562-MT663- MTPG-43 1/2EYFP, C) Clone K562-MT663-MTPG-43. En moyenne, les cellules contrôles ont affiché une taille inférieure aux clones. Indiquées par des astérisques, certaines cellules étaient surdimensionnées. Photos prises en microscopie à contraste de phases. Le grossissement est de 400x.

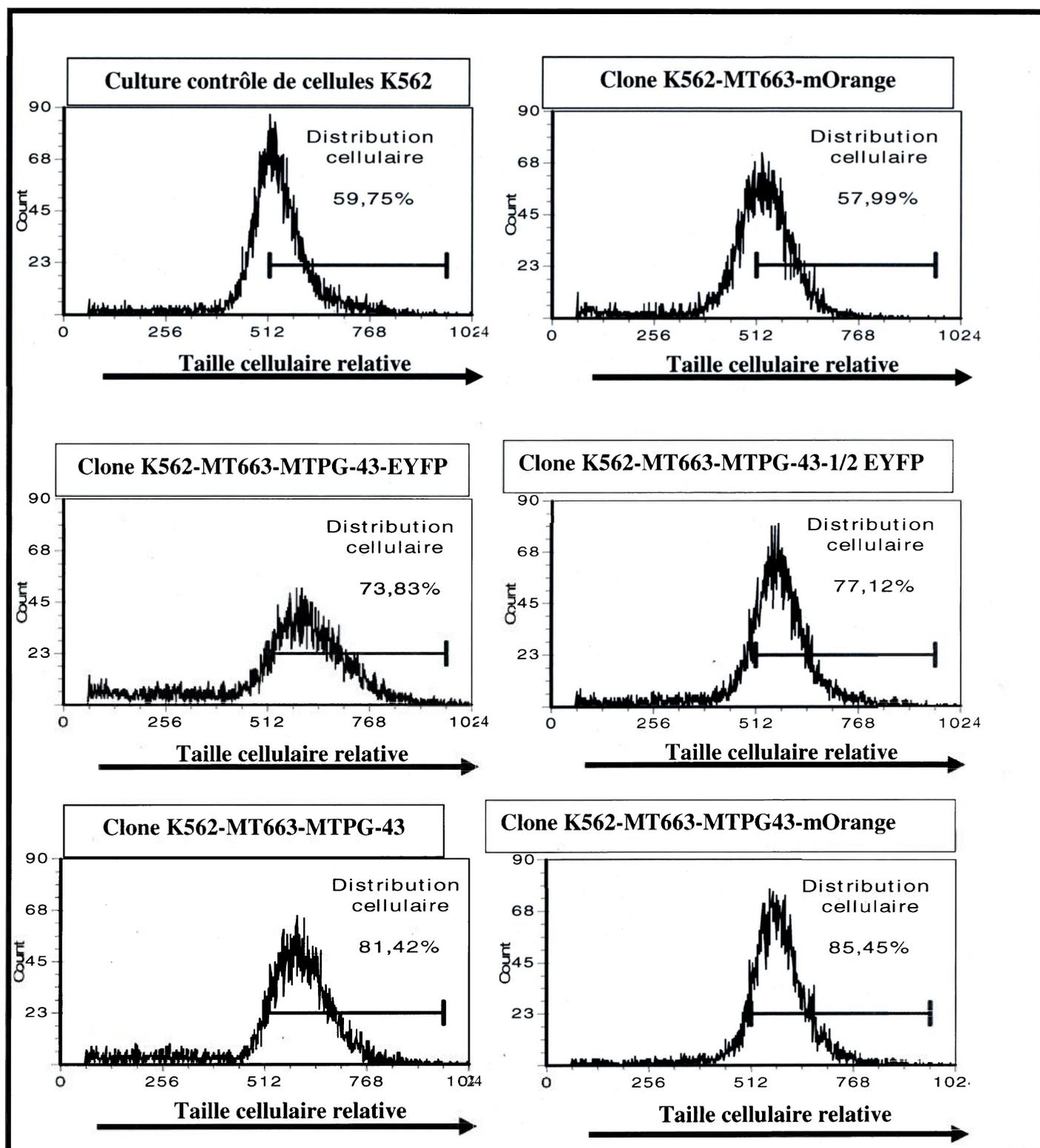


Figure 3.7.2 : Le peptide MTPG-43 est l'agent responsable de l'augmentation de la taille cellulaire. La barre rouge désigne l'intervalle qui a été choisi pour quantifier le nombre de cellules présentant une taille supérieure à 512. Le clone K562-MT663-mOrange prouve que le marqueur fluorescent et le plasmide pcDNA MT663 n'ont pas provoqué le gigantisme cellulaire. Les mesures ont été réalisées trois fois par culture 4 jours après chaque réensemencement cellulaire initiale de 100 000cellules/mL (3 réensemencements au

3.8 Le phénomène de polyploïdisation est dissocié du phénotype de gigantisme cellulaire

À la section précédente, les données ont indiqué que les clones sélectionnés ont vu leur taille s'accroître. Les MCs retrouvés *in vivo* et *in vitro* sont capables eux aussi de développer un tel phénotype[69,73]. Par contre, le phénomène est associé à une augmentation substantielle de leur contenu en ADN. Par conséquent, les clones en culture ont été soumis à une analyse du cycle cellulaire. Afin de vérifier l'effet du peptide MTPG-43 sur l'hyperploïdisation nucléaire des cellules K562, une coloration à l'iodure de propidium (IP) a été effectuée. Les échantillons fixés et colorés ont été analysés par cytométrie en flux tel que décrit à la section 2.9.1. La coloration à l'IP suggère que le phénotype de gigantisme cellulaire enclenché par le peptide MTPG-43 n'est pas accompagné par la polyploïdisation des noyaux (figure 3.8).

En somme, peu de modifications sont engendrées par l'expression du peptide MTPG-43 suite à l'analyse du cycle cellulaire. En effet, le rapport des cellules présentes en phase (Go/G1)/G2 ne montre pas de différence entre les clones et la culture contrôle ce qui suggère une prolifération inchangée. Par exemple, le rapport des phases (Go/G1)/G2 est de 1.94 et de 2.02 respectivement pour le clone K562-MT663-MTPG-43 et pour les cellules K562 contrôles. La proportion des cellules en 8N est également comparable (0.3% vs 0.5%). De nombreux débris cellulaires ont cependant été enregistrés lors du passage des échantillons en cytométrie en flux. Par exemple, il n'y a eu que 2% de débris dans l'échantillon de cellules contrôles comparativement à 45% en moyenne pour les échantillons de cellules du clone K562-MT663-MTPG-43. Cette observation a été effectuée sur tous les clones testés et celle-ci soulève l'hypothèse que l'expression du peptide fragiliserait les membranes cellulaires.

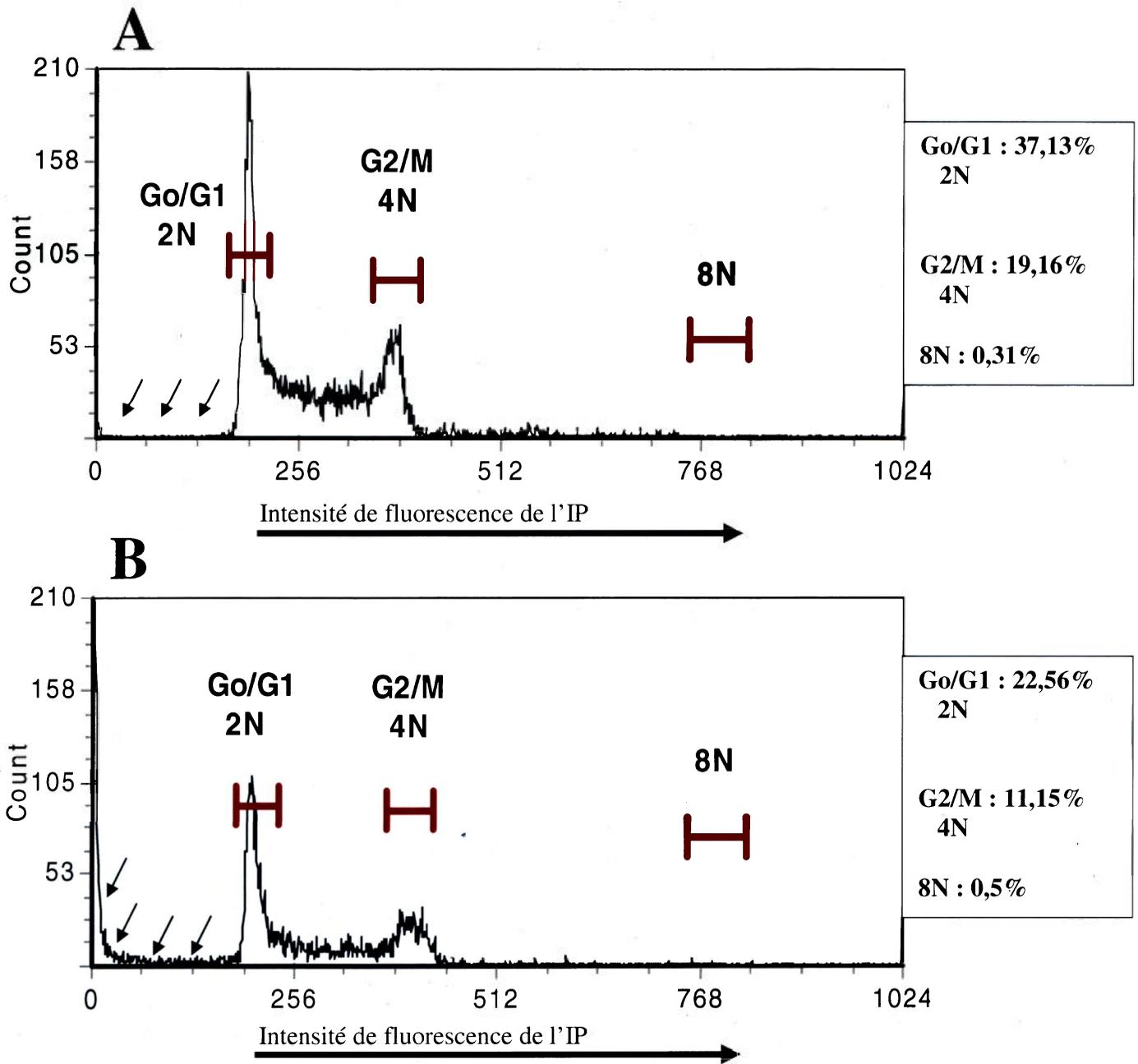


Figure 3.8 : La coloration à l'iode de propidium (IP) des clones n'a pas mis en évidence le phénomène d'hyperploïdisation nucléaire: A) Patron de fluorescence du contenu en ADN des cellules K562 non transformées, b) Patron de fluorescence du clone K562-MT663-MTPG-43 représentatif du contenu en ADN de tous les clones. Le pourcentage de cellules diploïdes, tétraploïdes et octaploïdes est indiqué à l'extrémité droite de chaque patron de fluorescence. Les flèches situées à la gauche du stade diploïdes (2N) indiquent les débris cellulaires enregistrés lors du passage des échantillons. L'analyse du cycle cellulaire a été effectuée par cytométrie en flux en triplicata pour chaque culture.

3.9 La production exogène de protéines chimériques n'affecte pas la prolifération cellulaire des cellules K562 transformées

Après avoir été en mesure de confirmer l'expression des transgènes et la localisation cellulaire des protéines chimériques, le taux d'expansion des clones a été calculé. Si le peptide parvient à empêcher la division cellulaire et à forcer l'apparition du phénotype de gigantisme cellulaire, cela devrait se refléter sur la prolifération des clones et sur la viabilité cellulaire. En effet, il aurait été logique de penser que l'ensemble des cellules K562 transformées soit retardé dans leur croissance selon les observations des sections précédentes

Cependant, rien de tel ne s'est produit. Les comptes de densité cellulaire ont été effectués en triplicata sur une période de 7 jours et tous les clones ont eu un profil d'expansion similaire à la culture contrôle (ensemencement cellulaire initiale à 100 000 cellules/mL). Les cellules ont proliféré au même rythme ce qui signifie que l'expression des transgènes n'a pas affecté la division cellulaire (figure 3.9). De plus, il est à noter que la viabilité cellulaire s'est maintenue supérieure à 90 % pour les 5 premiers jours de culture mais celle-ci a chuté à environ 80% au dernier compte cellulaire, probablement la conséquence d'une densité cellulaire trop élevée et un milieu de culture acidifié par les déchets métaboliques. Jusqu'à preuve du contraire, tout indique que le peptide n'a pas été cytotoxique pour les cellules K562 et n'a donc pas augmenté le taux de mortalité.

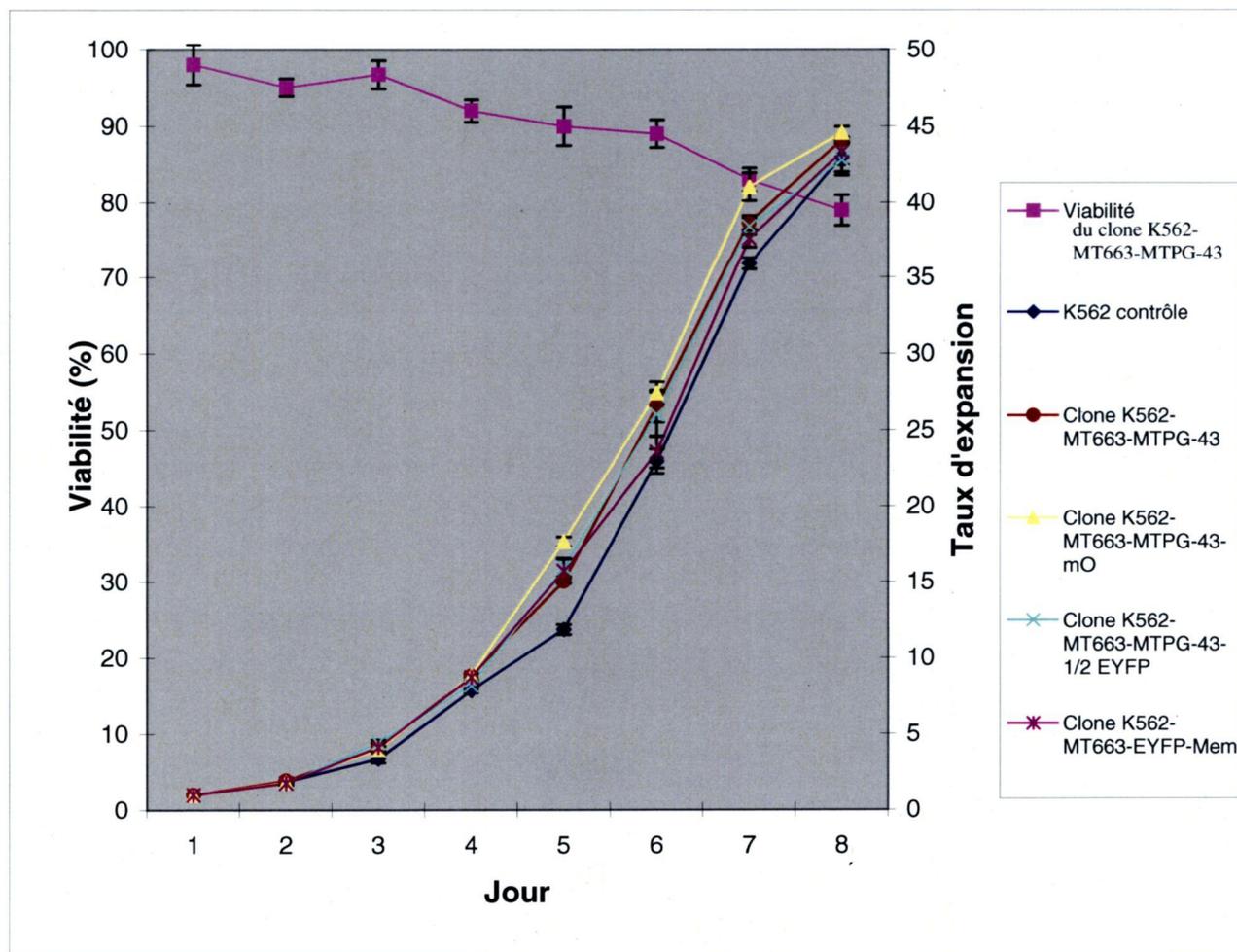


Figure 3.9 : Le taux d'expansion des clones en culture est comparable aux cellules contrôles.

Les lignées stables indiquées ainsi que les cellules contrôles ont été suivies sur une période de 7 jours. Les comptes cellulaires ont été réalisés en triplicata. Deux clones de chaque lignée ont été utilisés (n=8).

3.10 Modifications chimiques du peptide MTPG-43

Jusqu'à maintenant, nos résultats indiquent que le peptide MTPG-43 a été capable de forcer l'accroissement de taille cellulaire sans toutefois déclencher l'hyperploïdisation nucléaire dans les clones de cellules K562. Afin de mieux étayer le rôle que joue l'outil moléculaire dans le phénotype observé, nos travaux se sont concentrés, entre autre, sur l'importance de la palmitoylation du peptide et de sa forte accumulation à l'appareil de Golgi. Pour ce faire, nous avons étudié l'expression de la protéine MTPG-43-EYFP dans les cellules K562 en présence de composés perturbant sa modification post-traductionnelle normale et sa forte accumulation golgienne. Tel que décrit à la section 1.8, MTPG-43 subit une double palmitoylation réversible sur ses cystéines en position 3 et 4[103]. Le 2-bromo-palmitate est efficace pour accaparer la place du palmitate endogène. Cet acide gras modifié lie de façon irréversible les cystéines, empêchant du même coup l'ancrage membranaire du peptide[103]. De plus, afin de déstabiliser l'appareil de Golgi et par conséquent MTPG-43, la fragmentation en microgouttelettes de l'organelle peut être forcée par l'ajout de brefeldine A. Cette substance est décrite dans la littérature pour interférer avec les fonctions de l'appareil de Golgi[110]. Finalement, afin de forcer la polyploïdisation nucléaire des clones, l'inhibiteur SU6656 a été ajouté à leur milieu de culture. Il est reconnu pour forcer l'hyperploïdie[91,111]. Nous avons utilisé ce composé pour vérifier si la distribution du peptide MTPG-43 était modifiée dans les cellules polyplôides. Les produits énumérés ci-dessus ont donc leur propre spécificité d'action et peuvent permettre de caractériser davantage le peptide.

Selon les observations, l'ajout de 2-bromo-palmitate et de brefeldine A aux clones en culture a eu pour conséquence d'empêcher les protéines fluorescentes de s'ancrer à la membrane cytoplasmique et à l'appareil de Golgi (figure 3.10.1). Même aux concentrations intermédiaires (2-bromo-palmitate à 50 μ M et brefeldine A à 10mg/mL), les protéines ont été diffusées de façon homogène à l'intérieur des cellules ce qui signifie que le peptide a été déstabilisé à de faibles doses de produit chimique après seulement 24 heures d'incubation. Par conséquent, la résolution des membranes cellulaires en microscopie à fluorescence a été altérée. En d'autres mots, il est devenu impossible de distinguer la membrane cytoplasmique du reste du cytoplasme. La forte accumulation golgienne a elle aussi été

éprouvée dans les 24 premières heures de traitement. Aucune augmentation ou diminution du volume cellulaire n'a pas été observée chez les clones mis en présence de l'un ou l'autre de ces deux produits.

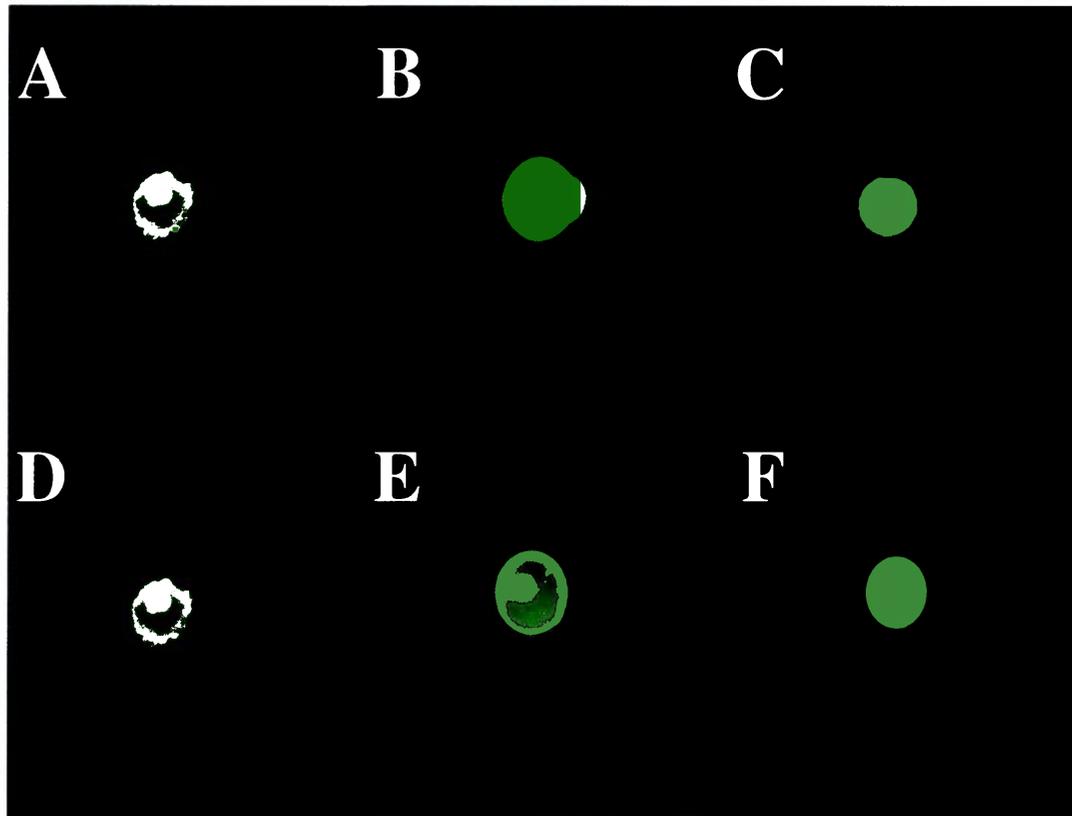


Figure 3.10.1. : Le 2-bromo-palmitate et la brefeldine A ont déstabilisé l'ancrage de la protéine MTPG-43-EYFP à la membrane et son agglomération à l'appareil de Golgi
Concentration du 2-bromo-palmitate a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M. Concentration de brefeldine A d) 0 mg/mL, e) 10 mg/mL, f) 20 mg/mL. La couleur verte est associée à la protéine chimérique MTPG-43-EYFP. La fine résolution de la structure membranaire a laissé la place à une diffusion homogène des protéines fluorescentes. La taille cellulaire est demeurée constante malgré l'ajout de ces deux substances. Les photos ont été prises en microscopie à fluorescence après 24 heures d'incubation. Le grossissement est 200X.

Par la suite, dans une autre série d'expériences, l'inhibiteur SU6656 a été ajouté aux clones en culture pour induire l'hyperploïdisation nucléaire. Afin de colorer sélectivement et sans traitement le contenu en ADN des clones, le colorant Hoechst 33343 a été ajouté au milieu de culture des cellules. Ceci a permis d'observer correctement les noyaux par

microscopie à fluorescence. Les concentrations de SU6656 utilisées ont eu le même effet mais à des temps d'incubation différents (figure 3.10.2). En d'autres mots, plus la concentration de SU6656 a été élevée, plus les cellules ont augmenté rapidement leur degré de ploïdie et leur volume cellulaire. Visuellement, la membrane cytoplasmique a toujours été bien définie. Le SU6656 n'a pas empêché la protéine MTPG-43-EYFP de s'y fixer tout comme cela a été le cas avec l'appareil de Golgi, fortement ciblé par la protéine fluorescente. Cependant, l'organelle a eu tendance à occuper plus d'espace à l'intérieur des cellules traitées avec l'inhibiteur comparativement avec les cellules contrôles. La viabilité cellulaire a été plus faible à 5 μ M (62%) qu'à 2.5 μ M (75%) ou 1 μ M (78%) sur une période de 72 heures d'incubation.

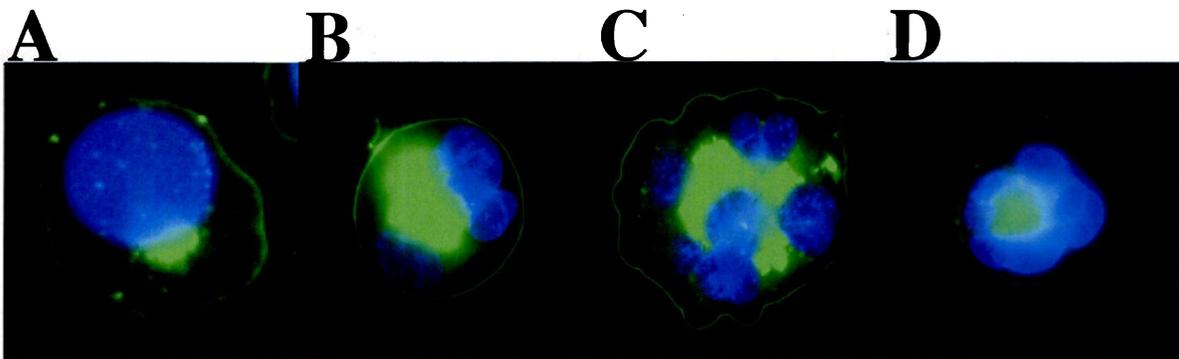


Figure 3.10.2 : Le SU6656 favorise l'hyperploïdie du clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP. Concentration du SU6656 a) 0 μ M, b) 1 μ M, c) 2.5 μ M, d) 5 μ M. La couleur verte est associée à la protéine chimérique MTPG-43-EYFP et la couleur bleue à l'ADN cellulaire grâce à l'ajout du colorant Hoechst 33343. Les cellules traitées présentent des noyaux polylobés mais la protéine n'a pas semblé améliorer ou diminuer l'effet du SU6656. Cependant, l'accumulation à l'appareil de Golgi a été perturbée. Les photos ont été prises en microscopie à fluorescence après 72 heures d'incubation. Le grossissement est 400X.

Les dernières observations suggèrent un effet possible du SU6656 sur l'appareil de Golgi. Une coloration au BODIPY a été effectuée comme à la section 3.6.3. Celle-ci a révélée que cette organelle s'est fragmentée suite à l'ajout du SU6656 et que les protéines MTPG-43-EYFP l'ont accompagné dans sa dispersion à l'intérieur des cellules. Comparativement aux cellules traitées au SU6656, les cellules contrôles ont conservé partiellement intact leur appareil de Golgi. Les protéines fluorescentes n'ont pas semblé

avoir été impliquées dans le phénomène. Elles sont demeurées accrochées aux membranes qui le composent

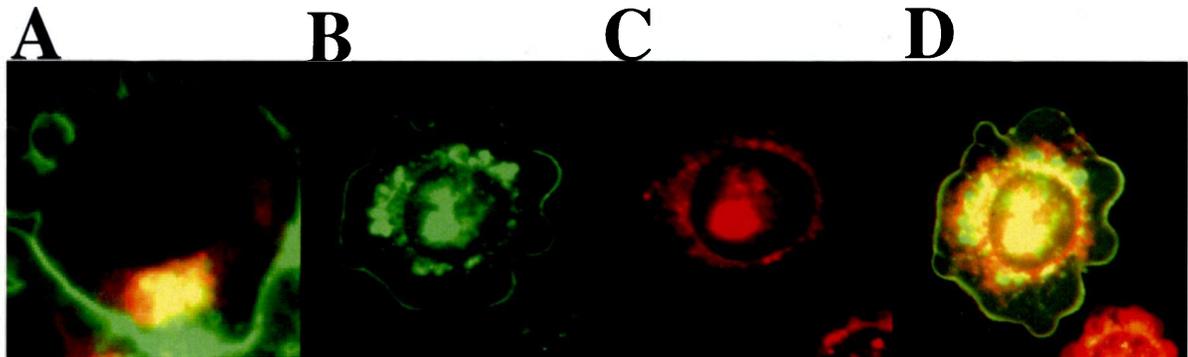


Figure 3.10.3 : Le SU6656 favorise la dispersion de l'appareil de Golgi et par conséquent du peptide MTPG-43 chez le clone K562-MT663-MTPG-43-EYFP. a) Sans SU6656, la protéine MTPG-43-EYFP, en vert, est fortement localisée dans l'appareil de Golgi en rouge (BODIPY). b) À raison d'une concentration de 2.5 μM de SU6656, la protéine MTPG-43-EYFP, en vert, c) et l'appareil de Golgi en rouge ont semblé réagir à la présence du SU6656. Bien que la protéine ait encore été associée à l'appareil de Golgi, celui-ci s'est fragmenté. d) les photos en b et c ont été superposées. Les photos ont été prises en microscopie à fluorescence après 72 heures d'incubation. Le grossissement est de 400X.

3.11 La mutagenèse dirigée indique que l'acylation du peptide MTPG-43 est essentielle pour le diriger à la membranane cytoplasmique

La mutagenèse dirigée est une technique employée en laboratoire pour modifier de façon précise et volontaire la séquence nucléotidique d'un gène. Le but d'introduire des mutations dans la séquence du gène MTPG-43 a été de vérifier l'implication de certains acides aminés qui subissent des modifications post-traductionnelle tel que l'acylation (ajout d'acides gras). Les mutations désirées ont ciblé les cystéines en position 3 et 4 du peptide mais aussi sur les acides aminés de la région hydrophobe de MTPG-43 (voir figure 1.8.3). Le tableau 4 résume les mutations apportées au peptide. Les résultats ont été obtenus avec l'aide de Marc-André Roy, étudiant stagiaire lors de l'été 2007.

Tableau 4. Les mutations apportées au peptide MTPG-43 et leurs impacts sur la modification post-traductionnelle[103,112]

Mutations	Impact sur la modification post-traductionnelle
M<u>G</u>C<u>V</u>MRR	Myristoylation de la glycine en position 2 et absence de palmitoylation de la cystéine en position 4
M<u>G</u>C<u>C</u>MRR	Myristoylation de la glycine en position 2
M<u>L</u>C<u>L</u>MRR	Absence de palmitoylation de la cystéine en position 4
M<u>L</u><u>L</u>L<u>M</u>R<u>R</u>	Absence d'acylation
M<u>L</u><u>L</u>C<u>M</u>R<u>R</u>	Absence de palmitoylation de la cystéine en position 3
M<u>G</u><u>L</u><u>L</u>M<u>S</u><u>R</u>	Myristoylation de la glycine en position 2
M<u>G</u>C<u>C</u><u>K</u><u>V</u><u>L</u>	Myristoylation de la glycine en position 2 et farnésylation ou géranylation de la cystéine en position 4
MLCCMRR (peptide sauvage)	Double palmitoylation des cystéines en position 3 et 4

Les différentes séquences nucléotidiques associées aux versions mutées du peptide MTPG-43 ont été insérées dans le plasmide ptag-mOrange pour les fusionner au marqueur fluorescent en question. L'analyse de l'effet des mutations a été testée par l'expression

transitoire des transgènes sous le contrôle du promoteur CMV. Par l'entremise de liposomes, des transfections transitoires ont été exécutées compte tenu des nombreuses manipulations qui ont dû être effectuées. Deux autres lignées cellulaires ont été utilisées en plus de la lignée K562 et elles se nomment HEK-293 et COS-7. Celles-ci ont été utilisées afin de détecter la localisation intracellulaire des protéines mutées. Les cellules HEK-293 et les cellules COS-7 sont des lignées cellulaires fibroblastiques adhérentes provenant respectivement d'un rein humain et d'un rein de singe. Le tableau 5 décrit les principales observations compilées au terme de 72 heures post-transfection.

Tableau 5 : Détection du peptide MTPG-43 selon les modifications engendrées par la mutagenèse dirigée

Types de cellules transfectées	Mutation	Détection	Particularité
K562	MGCVMRR	membranaire	Aucun changement significatif de morphologie cellulaire rapporté
	MGCCMRR	membranaire	
	MLCLMRR	Diffusion cytoplasmique	
	MLLLMRR	Diffusion cytoplasmique	
	MLLCMRR	Diffusion cytoplasmique	
	MGCKVLRR	membranaire	
	MGLMSR	membranaire	
	MLCCMRR (version non mutée)	membranaire	Taille accrue

Tableau 5 (suite) : Détection du peptide MTPG-43 selon les modifications engendrées par la mutagenèse dirigée

Type de cellules transfectées	Mutation	Détection	Particularité*
COS-7	M<u>G</u>C<u>V</u>MRR	membranaire	S/EA
	M<u>G</u>C<u>C</u>MRR	membranaire	S/EA
	M<u>L</u>C<u>L</u>MRR	Diffusion cytoplasmique	S/EA
	M<u>L</u>L<u>L</u>MRR	Diffusion cytoplasmique	S/EA
	M<u>L</u>L<u>C</u>MRR	Diffusion cytoplasmique	S/EA
	M<u>G</u>C<u>C</u>K<u>V</u>LRR	membranaire	Ramifications cellulaires
	M<u>G</u>L<u>L</u>M<u>S</u>R	membranaire	Ramifications cellulaires
	M<u>L</u>C<u>C</u>MRR	membranaire	Ramifications cellulaires
HEK 293	M<u>G</u>C<u>V</u>MRR	membranaire	S/EA
	M<u>G</u>C<u>C</u>MRR	membranaire	Ramifications cellulaires
	M<u>L</u>C<u>L</u>MRR	Diffusion cytoplasmique	S/EA
	M<u>L</u>L<u>L</u>MRR	Diffusion cytoplasmique	S/EA
	M<u>L</u>L<u>C</u>MRR	Diffusion cytoplasmique	S/EA
	M<u>G</u>C<u>C</u>K<u>V</u>LRR	membranaire	Ramifications cellulaires
	M<u>G</u>L<u>L</u>M<u>S</u>R	membranaire	Ramifications cellulaires
	M<u>L</u>C<u>C</u>M	membranaire	Ramifications cellulaires

*L'abréviation S/EA signifie sans effets apparents

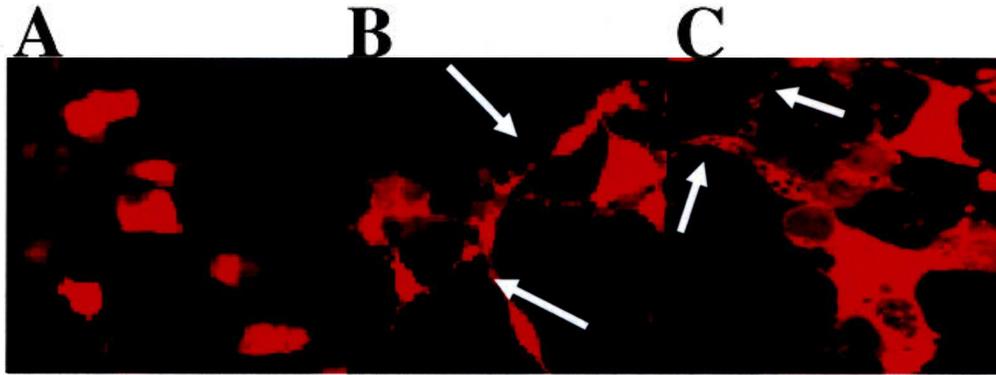


Figure 3.11 : Certaines versions du peptide muté provoquent des ramifications cellulaires dans les lignées HEK 293 et COS-7. a) diffusion cytoplasmique de la protéine mOrange dans les cellules HEK 293 b) phénotype membranaire d'un mutant MTPG-43 avec ramifications cellulaires dans les cellules HEK 293, c) phénotype membranaire d'un mutant MTPG-43 avec ramifications cellulaires dans les cellules COS-7. Les ramifications observées ressemblent à la formation et à l'élongation de pseudos axones. Les photos ont été prises en microscopie à fluorescence. Le grossissement est de 400X.

En somme, il a été possible de dégager plusieurs faits intéressants des transfections transitoires effectuées sur les cellules K562, HEK 293 et COS-7. Une palmitoylation simple (versions mutées MLCLMRR et MLLCMRR) a été insuffisante pour diriger le peptide à la membrane cytoplasmique tandis qu'une seule myristoylation (versions mutées MGCVMRR, MGCCMRR et MGLLMSR) le lui a permis. Ensuite, la combinaison d'acylation telle que myristoylation/farnésylation ou géranylation (version mutée MGCKVLR) a eu pour effet de cibler la membrane cytoplasmique. L'accumulation des peptides modifiés à l'appareil de Golgi a été faible comparativement au peptide sauvage doublement palmitoylé. De plus, certaines manifestations cellulaires ont retenu l'attention. Dans certains cas, les fibroblastes ont adopté une conformation ramifiée tel qu'illustré à la figure 3.11. Morphologiquement, les cellules transfectées ont modifié leur conformation comme si elles y étaient contraintes. Les mutations MGCKVLR, MGLLMSR ainsi que le peptide sauvage ont provoqués l'état ramifié des fibroblastes. Le phénotype de gigantisme cellulaire n'a pas été observé lors des transfections transitoires dans les cellules COS-7 et HEK 293.

3.12 Infection des CSHs provenant de sang de cordon ombilical à l'aide d'un vecteur adénoviral

Cette présente section traite de l'utilisation de particules adénovirales comme vecteur d'expression génétique de manière à forcer la production exogène du peptide MTPG-43 à l'intérieur des CSHs afin vérifier si la production de plaquettes *in vitro* peut être améliorée. Les CSHs ont été purifiées à partir de sang de cordon ombilical et placées en culture pour permettre leur prolifération afin d'en accumuler suffisamment pour les tests[113]. À titre informatif, il faut mentionner que le type d'adénovirus utilisé pour les expériences est le seul vecteur adénoviral connu capable d'infecter les CSHs. Il s'agit d'un adénovirus chimérique de type 5 avec le bouton de fibre d'un adénovirus de type 35.

Les adénovirus recombinants ont été construits avec la séquence nucléotidique du peptide MTPG-43 sans marqueur (voir la section 2.14.2) et le plasmide pAdTrack-MT+. Celui-ci a été par la suite introduit par électroporation dans des bactéries BJ5183 pour permettre la recombinaison homologue entre lui et le plasmide AdEasier-1 (squelette nucléotidique de l'adénovirus). Après l'amplification et la purification des particules virale dans les cellules QBI 293A, la quantité d'adénovirus recueillie a été suffisante pour la poursuite des expériences. La particularité de cette construction virale est qu'elle contient deux promoteurs : le CMV, qui régule l'expression de la protéine fluorescente GFP et le promoteur MT+ (promoteur MT663 modifié par Carl Simard) qui régule l'expression du transgène d'intérêt (MTPG-43 sans marqueur). La présence de la GFP est indispensable pour déterminer le nombre de cellules infectées.

Deux cultures de CSHs identifiées 2CB7BP et 7CBBQ ont été requises pour évaluer l'impact de la production du peptide MTPG-43. Dans les laboratoires d'Héma-Québec, les cultures de CSHs forcées à s'engager dans la lignée mégacaryocytaire sont suivit pendant 14 jours. Le milieu de différenciation nommé BS1[112] a été le seul et unique milieu à avoir été employé au cours des deux semaines de culture. Normalement, le processus d'endomitose est habituellement concentré entre les jours 7 et 10[73]. Par conséquent, les infections par adénovirus ont donc été arbitrairement effectuées au jour 8.

À 48 heures post-infection (jour 10), le nombre de cellules infectées, la taille des cellules infectées et le degré de ploïdie des cellules totales ont été quantifiés et analysés par cytométrie en flux. Le tableau 6 résume ces résultats.

Tableau 6 : Infection par des adénovirus recombinants sur des CSHs provenant de sang de cordon ombilical

Nom de la culture	Dose infectieuse (virus/cellules)	Nombre de cellules infectées (%)	Taille relative Distribution cellulaire (%)	Ploïdie (%)		
				2N	4N	8N
Cellules non infectées	-	-	-	52	11.43	2.03
Contrôle GFP-50	50	17.7	85.59	56	11	1.31
Contrôle GFP-100	100	19.8	83.88	57	9.93	1.02
MTPG-43-50	50	19.45	84.65	58	10	1.5
MTPG-43-100	100	21.8	78.53	57	10.53	1.37

La culture contrôle a été utile pour déterminer la distribution normale du degré de ploïdie des cellules non traitées. La majorité de celles-ci étaient diploïdes (52%) avec un nombre peu élevé de cellules ayant atteint un degré de ploïdie égale à 4N (11%) et encore plus faible pour un degré de ploïdie égale à 8N (2%). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres équipes de recherche[73,89]. Par la suite, seules les cellules infectées par des adénovirus contrôles et recombinant (en moyenne, 20% des cellules ont exprimées la GFP, signe d'une transduction efficace) ont été analysés et nos résultats sont comparables à la culture contrôle. En effet, il n'y a pas de différence significative tant au niveau du degré de ploïdie que de la taille relative et ce peu importe les doses infectieuses

utilisées. Tout semble indiquer que le peptide MTPG-43 ne favorise pas la polyploïdisation des CSHs en cours de différenciation mégacaryocytaire.

Au terme de 14 jours de culture, le nombre de plaquettes a pu être quantifié par cytométrie en flux. En utilisant des anticorps reconnaissant les marqueurs membranaires CD41 et CD42 et de l'IP (voir les sections 1.3.2 et 2.9.2), les MCs et les plaquettes ont pu être marqués. Pour faire la distinction entre MCs et plaquettes, il faut noter que les plaquettes ont une petite taille comparativement aux cellules matures et c'est sur cette caractéristique que l'on base la discrimination. La formule décrite ci-dessous permet de quantifier la production plaquettaire par cellulesensemencées initialement[114].

$$\frac{\text{Nombre de plaquettes produites/cellulesensemencées}}{\text{nombre total d'événements cellulaires}} = \frac{\text{Expansion totale} \times (\text{nombre d'événements IP négatif de plaquettes} \times (\% \text{CD41} + \% \text{CD42}))}{\text{nombre total d'événements cellulaires}}$$

Le tableau 7 présenté à la page suivante illustre les résultats moyens obtenus pour les deux cultures en parallèles.

Tableau 7 : Nombre de plaquettes produites par CSHsensemencées et infectées par des adénovirus recombinants selon la dose infectieuse

Nom de la culture	Dose infectieuse (virus/cellules)	Nombre de plaquettes/ cellulesensemencées
Cellules non infectées	0	165
Contrôle GFP-50	50	133
Contrôle GFP-100	100	148
MTPG-43-50	50	134
MTPG-43-100	100	145

Enfin, le nombre de plaquettes produites au terme de 14 jours de cultures a été moindre lorsque les CSHs ont été infectées par les adénovirus contrôles ou recombinants comparativement à la culture contrôle. Encore une fois, l'effet du peptide a semblé nul. Cependant, tout a porté à croire que l'infection elle-même a affecté les cellules et ce indépendamment de l'expression du peptide MTPG-43.

4 Discussion

La gestion et l'exploitation des concentrés plaquettaires demeurent à ce jour une priorité pour Héma-Québec. Le problème majeur auquel fait face cet organisme réside dans le délai d'entreposage et la température de conservation des plaquettes. Afin d'assurer l'efficacité des transfusions autologues et surtout de l'innocuité de celles-ci, les concentrés plaquettaires ne peuvent être en aucun cas conservés plus de 5 jours à une température oscillant entre 20 et 24°C. Cette réalité émane du fait que les plaquettes sont fragilisées et inactivées lors d'une cryoconservation et rapidement éliminées par le sujet humain transfusé. Jusqu'à preuve du contraire, maintenir les concentrés plaquettaires près du point de congélation est à proscrire. De plus, la prolifération bactérienne est toujours active à température pièce ce qui augmente les risques de septicémie lors de transfusions ultérieures. Une solution à ces problèmes logistiques envisagée à Héma-Québec est simple mais ambitieuse: produire des plaquettes en laboratoire grâce à la potentialité des CSHs retrouvées dans le sang de cordon ombilical.

Nul n'est besoin ici de répéter l'énorme capacité de différenciation cellulaire des CSHs car celle-ci a été encensée maintes fois autant dans les plus prestigieuses revues scientifiques que dans ce présent mémoire. Par contre, le problème rencontré lors de la production *in vitro* de plaquettes est toujours d'actualité: les MCs issus de la différenciation mégacaryocytaire des CBs ont une faible propension à augmenter leur degré de ploïdie et produisent par conséquent moins de plaquettes que leurs homologues retrouvés dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique[73].

Plusieurs études ont démontré l'efficacité des certains produits chimiques pour provoquer l'hyperploïdie dans des lignées cellulaires comme par exemple le SU6656, un inhibiteur des Srcs kinases[91]. Dans les CSHs, la vitamine hydrosoluble B₃, un inhibiteur de protéines histone déacétylases, s'est avérée efficace pour provoquer le même effet[88]. Ces deux produits ciblent et inhibent des éléments très précis de la mécanique moléculaire ce qui induit ainsi de façon spécifique les phénotypes escomptés soit la polyploïdisation nucléaire et le gigantisme cellulaire.

Les résultats des travaux effectués dans le cadre de ce projet de recherche ont identifié un outil moléculaire non cytotoxique qui peut recréer les changements morphologiques importants liés à la maturation des MCs mais sans les mêmes actions

inhibitrices que modulent les molécules décrites précédemment. En d'autres mots, l'outil moléculaire MTPG-43 est dépourvu de domaines effecteurs ou de groupements chimiques fonctionnels. Certes, il possède des propriétés physico-chimiques mais aucun site enzymatique ou de reconnaissance moléculaire n'est présent sur le peptide (voir section 1.8.3).

Initialement, il a été émis comme hypothèse que la protéine fluorescente EYFP attachée à la membrane puisse agir de la même façon qu'une autre famille de protéines nommée porine. La structure tridimensionnelle cylindrique creuse de EYFP ressemble aux membres de cette famille qui sont impliqués dans l'importation ou l'exportation de molécules. En effet, les porines sont présentes à la surface des membranes bactériennes et en périphérie des membranes nucléaires chez les eucaryotes[121,122]. Cette hypothèse a été mise de côté suite aux résultats obtenus avec les lignées cellulaires stables qui ont exprimé différentes versions de protéines chimériques.

De plus, nos résultats ont également indiqué que les promoteurs génétiques et les types de lignées cellulaires utilisées ont contribué à moduler inégalement la taille des cellules. En effet, l'expression des transgènes sous le contrôle du promoteur CMV a eu un impact plus important sur les cellules M07e que l'utilisation du promoteur MT663 dans les cellules K562. Une transfection transitoire avec le vecteur d'origine pcDNA-MTPG-43-EYFP a été effectuée dans les cellules K562 (résultats non montrés) mais le phénotype observé a été comparable aux résultats obtenus avec les lignées stables sous contrôle MT663. Le tout suggère que les lignées cellulaires utilisées ont réagi à des degrés différents à la présence du peptide. Selon les données disponibles, la lignée K562 est moins engagée dans la différenciation mégacaryocytaire que les cellules M07e ce qui a pu déclencher des réactions dépendantes des lignées cancéreuses. L'infrastructure cellulaire des cellules M07e est peut-être plus susceptible de réagir à MTPG-43 que les cellules K562. Toutefois, rien ne prouve qu'un degré de différenciation cellulaire plus élevé accroît l'effet du peptide dans les cellules où il est exprimé. Bref, des expériences plus poussées pourraient fournir des explications plus détaillées.

L'utilisation du promoteur MT663 inductible au zinc avait pour but de moduler le niveau d'expression des transgènes. L'absence de zinc dans le milieu de culture devait empêcher l'expression des transgènes tandis que l'ajout de ce métal devait favoriser l'augmentation du niveau transcriptionnel des protéines chimériques. Aucune variation

n'a été détectée tant à ce qui a trait à l'intensité de fluorescence (EYFP et mOrange) ou lors de l'immuno-empreinte (résultats non montrés). Une vérification de la modulation de l'expression de l'ARN messager des métallothionines dans les cellules K562 cultivées en présence de ZnSO₄ aurait pu être effectué par transfert Northern ou par QPCR et donner plus d'informations à propos de l'inductibilité de MT663. Certaines recherches réalisées dans les laboratoires d'Héma-Québec font toutefois état de l'expression constitutive de base de ce promoteur[108]

La détection du peptide MTPG-43 fusionné à l'EYFP ou à mOrange a été observée par microscopie à fluorescence. Il a été possible de localiser les protéines chimériques exprimées dans les lignées cellulaires stables tant au niveau de la membrane cytoplasmique que dans l'appareil du Golgi. Par contre, la détection des autres protéines chimériques non fluorescentes par immuno-empreinte ou immunofluorescence s'est avérée plus ardue parce que les anticorps utilisés pour la détection ne sont pas les mêmes pour les deux méthodes. En effet, les résultats obtenus à la figure 3.5.2 correspondent à l'utilisation d'un anticorps qui a ciblé directement le peptide MTPG-43 tandis qu'à la figure 3.5.3, les résultats obtenus correspondent à l'utilisation d'un anticorps qui a ciblé directement le marqueur HA. Bien que cela démontre exactement la même chose, il a été techniquement impossible de reproduire les résultats en inversant les anticorps c'est-à-dire cibler le marqueur HA pour l'immuno-empreinte et cibler MTPG-43 pour l'immunofluorescence.

À première vue, il semble incohérent d'avoir été incapable de réaliser ces deux méthodes avec le même anticorps. Pourtant, après avoir examiné attentivement les séquences en acides aminés des protéines ainsi que les propriétés physico-chimiques du peptide MTPG-43, le tout semble explicable. Premièrement, lors de la réalisation des constructions plasmidiques comprenant l'intégration du marqueur HA à la séquence nucléotidique des protéines, un site en particulier a retenu l'attention. En effet, il y a juxtaposition des acides aminés acide aspartique et proline. En parcourant la littérature, cette jonction particulière acide aspartique/proline est sensible à l'hydrolyse acide[138]. Donc, lors des manipulations visant à extraire les protéines intracellulaires, il se peut que le clivage ait pu s'effectuer lors de la manipulation des échantillons permettant ainsi au marqueur HA de se détacher du reste de la protéine. Alors, la détection par immuno-empreinte est vraisemblablement difficile à réaliser avec l'anticorps ciblant directement

le peptide HA. En ce qui concerne les problèmes reliés à la détection directe de MTPG-43 par immunofluorescence, tout porte à croire que l'accessibilité de l'épitope du peptide a été masquée. En effet, le peptide palmitoylé a semblé être contraint d'adopter une position qui a restreint ou empêché les interactions nécessaires à la capture de l'antigène. L'ancrage de notre outil moléculaire à cette structure cellulaire a peut-être empêché les anticorps dirigé contre MTPG-43 d'atteindre le peptide. Alors, seul le marqueur HA a été physiquement disponible et suffisamment exposé à l'extérieur de la membrane pour que les anticorps aient eu l'opportunité s'y fixer.

L'ensemble des résultats obtenus par microscopie à fluorescence et immunofluorescence a indiqué que la membrane cytoplasmique ainsi que l'appareil de Golgi ont été les cibles de choix du peptide MTPG-43. Tout d'abord, l'accumulation ponctuelle du peptide à la membrane est en accord avec la théorie de la mosaïque fluide[123-124] Celle-ci stipule que les éléments cellulaires tels que les radeaux lipidiques sont constamment en mouvement sur la bicouche de phospholipides. En d'autres mots, le peptide MTPG-43 pourrait avoir été distribué aléatoirement compte tenu du perpétuel déplacement des microdomaines de PI(4,5)P₂. De plus, comme le montre la figure 3.6.1, le peptide n'a pas semblé forcer le pontage de ces radeaux. Par exemple, dans les lymphocytes B, le regroupement des BCRs qui ont lié leurs antigènes permet une signalisation intracellulaire beaucoup plus forte[125]. En ce qui a trait aux observations microscopiques des lignées stables de cellules K562, ce phénomène n'a pas été provoqué.

Par la suite, une forte accumulation des protéines chimériques a été constatée au sein de l'appareil de Golgi ce qui a été mis en évidence lors des colorations avec l'agent chimique BODIPY à la figure 3.6.3. Deux éléments de réponse peuvent expliquer ce fait. Tout d'abord, les radeaux lipidiques de PI(4,5)P₂ sont fabriqués, en partie, à l'intérieur de cet organelle[136]. Il est donc possible que MTPG-43 ait pu s'ancrer à ces radeaux bien avant que ceux-ci puissent être délivrés à la membrane par des vésicules de transport. Par ailleurs, il est à noter que l'appareil de Golgi contient la machinerie enzymatique nécessaire à la palmitoylation du peptide et que celui-ci ait été acheminé au Golgi suite à sa traduction dans le réticulum endoplasmique[103,136]. D'autre part, la surexpression de l'outil moléculaire MTPG-43 a peut-être forcé la cellule à vouloir s'en départir. Un système de dégradation protéique fait intervenir la voie de transport antérograde qui est lié à la fonction cellulaire de l'appareil de Golgi[126]. La forte accumulation observée

dans cet organelle est possiblement liée à la mobilisation des constituants cellulaires nécessaires pour se débarrasser du peptide.

L'observation la plus frappante a été que tous les clones qui ont surexprimé MTPG-43 ont augmenté en taille. Les photographies en microscopie à contrastes de phases et les analyses par FACS l'ont confirmé. La possibilité de fusion cellulaire a été exclue suite au mélange de clones qui ont exprimé deux marqueurs fluorescents différents dans le même milieu de culture. Suivie pendant quelques jours, cette culture hétérogène n'a pas permis de visualiser des cellules exprimant à la fois l'EYFP et mOrange (résultats non montrés).

Après avoir été en mesure de prouver que le peptide seul était capable d'induire l'augmentation de taille des cellules M07e et K562, l'hypothèse de départ n'a été que partiellement validée. En effet, l'affinité du peptide pour la membrane cytoplasmique a été frappante mais la division cellulaire n'a pas été affectée ce qui a suggéré que la mécanique moléculaire de formation du sillon de clivage n'a pas été freinée. L'hyperploïdie n'a pas été forcée non plus. Tout porte à croire que ces deux phénomènes (polyploïdisation et gigantisme cellulaire) liés à la maturation des MCs suivent un ordre précis au terme de la différenciation mégacaryocytaire. Par exemple, une cellule polyploïde a nécessairement augmenté de taille mais une cellule qui accroît son volume n'implique pas obligatoirement le phénomène de polyploïdisation. À la lumière des observations compilées, il a été possible de déclencher un processus sans forcer l'autre ce qui suggère que le processus d'hyperploïdisation est situé en amont de l'accroissement de taille suite à une signalisation cellulaire qui oriente les CSHs à s'engager dans la voie de différenciation mégacaryocytaire. Bref, le degré de ploïdie semble déterminer le volume cellulaire final si et seulement si le premier module le second.

Cette idée qui a été mise de l'avant fait intervenir le concept du ratio nucléocytoplasmique (N:C). Selon celui-ci, la cellule tente de maintenir un équilibre entre la taille de son noyau et son volume cytoplasmique[133,134]. En d'autres termes, la taille d'une cellule est corrélée à son contenu en ADN. Par contre, plusieurs contre-exemples semblent indiquer que le maintien constant du ratio N:C n'est pas toujours respecté et c'est ce qui est démontré avec les résultats obtenus à la section 3 de ce mémoire. En effet, la taille cellulaire a augmenté mais la majorité des cellules sont demeurées au stade diploïde. Le ratio N:C dans ce cas-ci a diminué. L'équilibre a été

déplacé. Alors, pourquoi les lignées stables créées n'ont-elles pas augmenté leur degré de ploïdie? Selon toute vraisemblance, ce ratio N:C n'agit pas comme un point de contrôle cellulaire mais plutôt comme une contrainte spatiale[133,134].

À en juger par l'absence d'effets sur la prolifération et le degré de ploïdie des cellules, l'augmentation de taille des cellules n'a pas fait intervenir un mécanisme d'endomitose. Basé sur les résultats des taux d'expansion des lignées stables présentés à la figure 3.9, les cellules n'ont pas été freinées dans leur prolifération cellulaire. Contrairement à des MCs en pleine période d'endomitose, les clones ont poursuivi leur division cellulaire ce qui est incohérent avec le phénomène endomitotique. Si tel avait été le cas, un plateau aurait été constaté sur le graphique de la figure 3.9. De plus, les analyses par FACS suite à la coloration à l'iodure de propidium des clones n'ont révélé que des traces négligeables de cellules polyploïdes tel que présentées à la figure 3.7.2. Cependant, lors des manipulations visant à quantifier l'ADN génomique des cellules, 45% des lectures enregistrées sont des débris cellulaires, c'est-à-dire que certaines cellules n'ont pas survécues au traitement. Plusieurs protocoles de colorations ont été suivis mais le pourcentage est demeuré inchangé. Donc, il est possible de croire que la surproduction du peptide MTPG-43 a fragilisé les membranes cellulaires. Une fraction des cellules hautement polyploïdes a donc pu être perdue lors du traitement. Cependant, l'analyse des cellules par microscopie à fluorescence indique qu'il n'y a pas d'augmentation notable du nombre de cellules polyploïdes.

La section 3.10 de ce mémoire fait référence aux modifications chimiques et génétiques apportées au peptide MTPG-43. Tout d'abord, l'ajout du 2-bromo-palmitate et de la brefeldine A au milieu de culture des clones a eu le même effet, c'est-à-dire que la protéine MTPG-43-EYFP s'est dispersée à l'intérieur du cytoplasme. L'ensemble des observations a suggéré que le peptide a réagi à la présence de ces deux agents chimiques. Dans les deux cas, il a été impossible de distinguer la membrane cytoplasmique et l'appareil de Golgi sauf exception. Il a été rapporté que la brefeldine A inhibe la palmitoylation par son action sur l'appareil de Golgi et c'est ce qui a été observé à la figure 3.10.1[103]. Il n'y a pas eu d'effets sur la taille finale des cellules ou la polyploïdisation de celles-ci.

L'effet du produit SU6656 dans le milieu de culture des lignées stables s'est manifesté par l'hyperploïdisation des cellules. La présence de noyaux polylobés en a été

la preuve. La membrane cytoplasmique a toujours été bien définie. Toutefois, cet inhibiteur de Src kinases a semblé déstabiliser l'appareil de Golgi. La figure 3.10.3 illustre ce phénomène. De tels résultats auraient pu se reproduire avec la brefeldine A mais cela n'a pas été le cas. Bref, si la polyploïdisation implique la dispersion de l'organelle de Golgi, cela indique que le SU6656 enclenche un processus biologique qui y parvient. Une étude a mis en évidence que l'absence de trois Src kinases dans la lignée cellulaire appelée SYF a perturbé l'organisation structurale de l'appareil de Golgi[135] mais l'absence de données sur le degré de ploïdie nucléaire de ces cellules ne permet pas d'élaborer davantage sur le sujet.

D'un autre côté, la fragmentation de l'appareil de Golgi est indispensable pour l'entrée en mitose chez les cellules de mammifères[137]. Cette séparation assure une partition égale de cette organelle entre les deux cellules filles formées au terme de la mitose. Étonnamment, nos données sont contradictoires. En effet, l'ajout de SU6656 semble perturber l'appareil de Golgi en forçant supposément sa dispersion. Cependant, les cellules deviennent polyploïdes et ne se divisent pas. L'effet contraire est observé avec le peptide MTPG-43. La forte concentration du peptide au sein de l'appareil de Golgi pourrait empêcher l'organelle de se disperser en microgouttelettes. Par contre, les cellules sont majoritairement au stade diploïde du cycle cellulaire(figure 3.8). L'étude de la polyploïdisation est peut-être étroitement liée à l'appareil de Golgi.

Par la suite, la mutagenèse dirigée a fourni plusieurs éléments de discussion en ce qui concerne les modifications post-traductionnelles du peptide. Tel qu'illustré au tableau 4, il a été possible de dégager plusieurs faits saillants des transfections transitoires effectuées sur les cellules K562, HEK 293 et COS-7. Une palmitoylation simple a été insuffisante pour diriger le peptide à la membrane cytoplasmique. En accord avec la littérature, il semble qu'une double palmitoylation soit exigée[102]. La présence d'un seul ou plusieurs groupements myristates ou farnélates sur le peptide dirige ce dernier à la membrane, tout comme la version non mutée de MTPG-43. Le caractère irréversible de ces modifications peut en partie expliquer ces résultats[101]. Par contre, rien n'indique que ces modifications ont permis au peptide de cibler les radeaux lipidiques. La saturation de l'appareil de Golgi n'a pas été observée avec les peptides myristoylés farnésylés ou géranylés. Cette observation étoffe un peu plus l'hypothèse avancée que certaines versions mutés ne ciblent pas les radeaux lipidiques.

De plus, certaines manifestations cellulaires ont retenu l'attention. Dans certains cas, les fibroblastes adoptaient une conformation ramifiée telle qu'illustrée à la figure 3.11. Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus avec les cellules adhérentes HEK 293 et COS-7. Certaines cellules ont ressemblé morphologiquement à des cellules neuronales avec la présence de pseudos axones. Les mutations MGCCKVLRR et MGLLMSR ainsi que le peptide sauvage ont provoqué le même degré de ramification chez tous les fibroblastes.

Les dernières expériences ont consisté à infecter des cellules souches de sang de cordon à l'aide d'un vecteur adénoviral contenant la séquence nucléotidique du peptide MTPG-43. Infectées au jour 8, les cellules souches hématopoïétiques n'ont pas augmenté de taille et ne sont pas devenues polyploïde. Le faible taux d'infection (environ 20%) a possiblement joué sur les résultats. Cependant, une augmentation de la taille finale des cellules infectée était attendue tout comme il avait été observé avec les lignées stables mais aucune donnée ne va en ce sens. Bien sûr, la méthode de surproduction du peptide MTPG-43 dans les CSHs n'a pas été la même que celle appliquée aux cellules K562. L'électroporation est une méthode valable qui aurait pu être appliqué mais il n'en demeure pas moins que l'infection par des adénovirus demeure convenable pour les CSHs.

Au terme de 14 jours de culture des CSHs dans le milieu BS1[113] (milieu favorisant la différenciation mégacaryocytaire), le nombre de plaquettes produites par cellules souchesensemencées au départ est un peu plus faible que les cultures contrôles. Tout porte à croire que l'infection des CSHs par adénovirus diminue leur rendement. Appuyé par les résultats obtenus par les cultures infectées par le virus contrôle, le nombre de plaquette est moindre et ce, indépendamment de la production endogène du peptide MTPG-43. Jusqu'à preuve du contraire, l'infection des CSHs abaisse la production finale de plaquettes.

5 Conclusion

Le peptide MTPG-43 s'est avéré un outil moléculaire efficace pour déclencher l'augmentation de la taille cellulaire des lignées humaines apparentées aux MCs. À partir de la décortication de la protéine chimérique d'origine MTPG-43-EYFP, le peptide MTPG-43 a été isolé et il a été reconnu comme l'agent responsable des changements morphologiques observés dans les lignées cellulaires M07e, K562, HEK 293 et COS-7. Cependant, la prolifération cellulaire et le contenu en ADN des cellules K562 transformées n'ont pas été modifiés. Ces observations indiquent que le peptide MTPG-43 ne provoque pas le processus d'endomitose et que l'augmentation de la taille cellulaire causé par l'expression endogène du peptide n'est pas associée à la polyploïdisation nucléaire des cellules. Par ailleurs, le peptide MTPG-43 a été localisé irrégulièrement à la membrane cytoplasmique des clones de cellules K562. De plus, l'outil moléculaire MTPG-43 s'est fortement accumulé à l'appareil de Golgi. En modifiant chimiquement le peptide avec des produits chimiques qui inhibent l'acylation et qui perturbent l'appareil de Golgi, le peptide a perdu sa capacité à cibler les membranes cytoplasmiques ou golgiennes. La double palmitoylation que subit MTPG-43 sur ses cystéines en position 3 et 4 est cruciale pour maximiser sa liaison hydrophobe avec les acides gras qui composent les membranes cellulaires. Par la mutagenèse dirigée, l'importance de la présence des cystéines et de leurs palmitoylations sur le peptide MTPG-43 a été démontrée. D'autres types d'acylation ont été analysés mais les conséquences ont été davantage suggestives. Le lien entre la polyploïdisation et le rôle que joue l'appareil de Golgi pourrait s'avérer être une piste de recherche intéressante selon les observations compilées avec l'inhibiteur de Src kinases SU6656. La dispersion de cette organelle semble être liée de près ou de loin au phénomène d'hyperploïdisation nucléaire. De plus, bien que le peptide MTPG-43 ne favorise pas l'endomitose, il favorise tout de même l'augmentation de la taille ce qui pourrait se traduire par une expression de protéines accrue. Par exemple, des hybridomes ou des lymphocytes B qui augmentent de taille suite à l'expression du peptide MTPG-43 pourraient peut-être produire plus d'anticorps. L'étude du mécanisme de la polyploïdisation des MCs demeure à ce jour un processus biologique partiellement incompris. Finalement, le mécanisme moléculaire complexe qui régule les dernières étapes de la différenciation mégacaryocytaire nécessite davantage de perspectives de recherche afin d'expliquer le phénomène de l'endomitose.

6 Bibliographie

- 1 van de Ven, C., Collins, D., Bradley, M.D., Morris, E., Cairo, M.S., *The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration*. Experimental Hematology, 2007. **35**(12): p.1753-65.
- 2 Goldstein, G., Toren, A., Nagler, A., *Transplantation and other uses of human umbilical cord blood and stem cells*. Current Pharmaceutical Design, 2007. **13**(13): p. 1363-73.
- 3 Goldstein, G., A. Toren, A. Nagler, *Human umbilical cord blood biology, transplantation and plasticity*. Current Medicinal Chemistry 2006. **13**(11): p. 1249-59.
- 4 Fung, M.K., Downes, K.A., Shulman, I.A., *Transfusion of platelets containing ABO-incompatible plasma: a survey of 3156 North American laboratories*. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 2007. **131**(6): p. 909-16.
- 5 Tomonari, A., Takahashi, S., Ooi, J., Tsukada, N., Konuma, T., Kobayashi, T., Sato, A., Iseki, T., Yamaguchi, T., Tojo, A., Asano, S., *Impact of ABO incompatibility on engraftment and transfusion requirement after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan..* Bone Marrow Transplantation, 2007. **40**(6): p. 523-528.
- 6 Bonacossa, I.A., *Alloimmunization as a problem for platelet transfusion*. Transfusion Medicine Reviews, 1990. **4**(2): p. 144-8.
- 7 Pelletier, N., Lagueux, O., Armand, D., *Rapport annuel 2005-2006 d'Hémo-Québec*, 2005-2006: p. 28.
- 8 Mollison, P., Engelfriet, P., *Blood transfusion*. Seminars in Hematology, 1999. **36**(suppl 7): p. 48-58.
- 9 Barbara, J.B., *Blood cells: a practical guide*. 4th edition. 2006, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd: Massachusetts.
- 10 Golde, D., Gasson, J., *Hormones that stimulate the growth of blood cells*. Scientific American, 1988. **8**(8): 3434-3438
- 11 Kaushansky, K., *Lineage-specific hematopoietic growth factors*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(19): p. 2034-45.
- 12 Bonnet, D., *Haematopoietic stem cells*. The Journal of Pathology, 2002. **197**(4): p. 430-40.

- 13 Morrison, S.J., Uchida, N., Weissman, I.L., *The biology of hematopoietic stem cells*. Annual Review of Cell Developmental Biology, 1995. **11**: p. 35-71.
- 14 Szalai, G., LaRue, A.C., Watson, D.K., *Molecular mechanisms of megakaryopoiesis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006. **63**(21): p. 2460-76.
- 15 Schipper, L.F., Brand, A., Reniers, N., Melief, C.J., Willemze, R., Fibbe, W.E., *Differential maturation of megakaryocyte progenitor cells from cord blood and mobilized peripheral blood*. Experimental Hematology, 2003. **31**(4): p. 324-30.
- 16 Passegue, E., *Hematopoietic stem cells, leukemic stem cells and chronic myelogenous leukemia..* Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 266-8.
- 17 Sell, S., *Stem cells*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2004
- 18 Kaushansky, K., *Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. **1044**: p. 139-41
- 19 Sutherland, D.R., Keating, A., Nayar, R., Anania, S., Stewart, A.K., *Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry*. Experimental Hematology, 1994. **22**(10): p. 1003-10.
- 20 Steen, R., G.E. Tjonnfjord, Egeland, T., *Comparison of the phenotype and clonogenicity of normal CD34+ cells from umbilical cord blood, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and adult human bone marrow*. Journal of Hematotherapy, 1994. **3**(4): p. 253-62.
- 21 Israels, L.G., Israels, E.D., *Mechanisms in Hematology*. 3rd edition., Core Health Services Inc., Manitoba, Canada, 2002
- 22 Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Robey, P.G., *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 180-92.
- 23 Dormady, S.P., Bashayan, O., Dougherty, R., Zhang, X.M., Basch, R.S., *Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment*. Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research, 2001. **10**(1): p. 125-40.
- 24 Charbord, P., *Le micro-environnement médullaire chez l'homme normal et pathologique*. Hématologie, 1998. **4**(1): p.29-40

- 25 Bianco, P. and P. Gehron Robey, *Marrow stromal stem cells*. Journal of Clinical Investigation. 2000. **105**(12): p. 1663-8.
- 26 Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M., Gerson, S.L., *Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells*. Journal of Cellular Physiology, 1998. **176**(1): p. 57-66.
- 27 Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Haynesworth, S.E., Bruder, S.P., Gerson, S.L., *Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages*. Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research, 2000. **9**(6): p. 841-8.
- 28 Maurer, A.M., Liu, Y., Caen, J.P., Han, Z.C., *Ex vivo expansion of megakaryocytic cells*. International Journal of Hematology, 2000. **71**(3): p. 203-10.
- 29 George, J.N., *Platelets*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1531-9.
- 30 Vjestica, A., Tang, X.Z., Oliferenko, S., *The Actomyosin Ring Recruits Early Secretory Compartments to the Division Site in Fission Yeast*. Molecular Biology of the Cell, 2008.
- 31 Shivdasani, R.A., *Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 397-407.
- 32 Kaushansky, K., *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(12): p. 3339-47.
- 33 Deutsch, V.R., Tomer, A., *Megakaryocyte development and platelet production*. British Journal of Haematology, 2006. **134**(5): p. 453-66.
- 34 Michelson, A.D., *Platelets*, Elsevier Academic Press, 2002, San Diego, CA, USA
- 35 Italiano, J.E. Jr., Lecine, P., Shivdasani, R.A., Hartwig, J.H., *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. The Journal of Cell Biology, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
- 36 Kaushansky, K., *The enigmatic megakaryocyte gradually reveals its secrets*. Bioessays, 1999. **21**(4): p. 353-60.

- 37 Cramer, E.M., *Megakaryocyte structure and function*. Current Opinion in Hematology, 1999. **6**(5): p. 354-61.
- 38 Kaushansky, K., Drachman, J.G., *The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3359-67.
- 39 Yang, H., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T., *Higher pH promotes megakaryocytic maturation and apoptosis*. Stem Cells, 2002. **20**(4): p. 320-8.
- 40 Debili, N., Issaad, C., Massé, J.M., Guichard, J., Katz, A., Breton-Gorius, J., Vainchenker, W., *Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation*. Blood, 1992. **80**(12): p. 3022-35.
- 41 Ito, T., Tajima, F., Ogawa, M., *Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells*. Experimental Hematology, 2000. **28**(11): p. 1269-73.
- 42 Tomer, A., *Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2722-7.
- 43 Mathur, A., Hong, Y., Wang, G., Erusalimsky, J.D., *Assays of megakaryocyte development: surface antigen expression, ploidy, and size*. Methods in Molecular Biology, 2004. **272**: p. 309-22.
- 44 Carrell, N.A., Fitzgerald, L.A., Steiner, B., Erickson, H.P., Phillips, D.R., *Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy*. The Journal of Biological Chemistry, 1985. **260**(3): p. 1743-9.
- 45 Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V., Fitzgerald, L.A., *The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex*. Blood, 1988. **71**(4): p. 831-43.
- 46 Levene, R.B., Lamaziere, J.M., Broxmeyer, H.E., Lu, L., Rabellino, E.M., *Human megakaryocytes. V. Changes in the phenotypic profile of differentiating megakaryocytes*. The Journal of Experimental Medicine, 1985. **161**(3): p. 457-74.

- 47 Rabellino, E.M., Levene, R.B., Leung, L.L., Nachman, R.L., *Human megakaryocytes. II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes*. The Journal of Experimental Medicine, 1981. **154**(1): p. 88-100.
- 48 Kaushansky, K., *The mpl ligand: molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development*. Stem Cells, 1994. **12 Suppl 1**: p. 91-6; discussion 96-7.
- 49 Kaushansky, K., *Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production*. Blood, 1995. **86**(2): p. 419-31.
- 50 Kaushansky, K., *Thrombopoietin: basic biology and clinical promise*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 3**: p. 426-7.
- 51 Kaushansky, K., *Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. **1**(7): p. 1587-92.
- 52 Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A., Orkin, S.H., *A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development*. The EMBO Journal, 1997. **16**(13): p. 3965-73.
- 53 Hsu, T., Trojanowska, M., Watson, D.K., *Ets proteins in biological control and cancer*. Journal of Cellular Biochemistry, 2004. **91**(5): p. 896-903.
- 54 Oikawa, T., Yamada, T., *Molecular biology of the Ets family of transcription factors*. Gene, 2003. **303**: p. 11-34.
- 55 Seth, A., Watson, D.K., *ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer*. European Journal of Cancer, 2005. **41**(16): p. 2462-78.
- 56 Hart, A., Melet, F., Grossfeld, P., Chien, K., Jones, C., Tunnacliffe, A., Favier, R., Bernstein, A., *Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and*

is hemizyously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity*, 2000. **13**(2): p. 167-77.

57 Spyropoulos, D.D., Pharr, P.N., Lavenburg, K.R., Jackers, P., Papas, T.S., Ogawa, M., Watson, D.K., *Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. **20**(15): p. 5643-52.

58 Holmes, M.L., Bartle, N., Eisbacher, M., Chong, B.H., *Cloning and analysis of the thrombopoietin-induced megakaryocyte-specific glycoprotein VI promoter and its regulation by GATA-1, Fli-1, and Sp1*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(50): p. 48333-41.

59 Eisbacher, M., Holmes, M.L., Newton, A., Hogg, P.J., Khachigian, L.M., Crossley, M., Chong, B.H., *Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding*. *Molecular and Cellular Biology*, 2003. **23**(10): p. 3427-41.

60 Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., Philipsen, S., *GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis*. *Molecular and Cellular Biology*, 2005. **25**(4): p. 1215-27.

61 Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., Orkin, S.H., *Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(22): p. 12355-8.

62 Schulze, H. and R.A. Shivdasani, *Molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2004. **30**(4): p. 389-98.

63 Muntean, A.G., Crispino, J.D., *Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development*. *Blood*, 2005. **106**(4): p. 1223-31.

- 64 Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B., Orkin, S.H., *Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG*. *Genes and Development*, 1998. **12**(8): p. 1176-88.
- 65 Onedora, K., Shavit, J.A., Motoashi, H., Yamamoto, M., Engel, J.D., *Perinatal synthetic lethality and hematopoietic defects in compound mafG:mafK mutant mice*. *The EMBO Journal*., 2000. 19: p1335-1345.
- 66 Patel, S.R., Hartwig, J.H., Italiano, J.E., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(12): p. 3348-54.
- 67 McCabe White, M., Jennings, L.K., *Platelets Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures*. Academic Press, 1999.
- 68 Furie, B., Furie, B.C., *Thrombus formation in vivo*, *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, **115**: (12):3355-62.
- 69 Jobin, F.R., *L'Hémostase*, édition Maloine, Les Presses de l'Université Laval, 1995.
- 70 Zimmet, J., Ravid, K., *Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system*. *Experimental Hematology*, 2000. **28**(1): p. 3-16.
- 71 Nagata, Y., Muro, Y., Todokoro, K., *Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis*. *The Journal of Cell Biology*, 1997. **139**(2): p. 449-57.
- 72 Roy, L., Coullin, P., Vitrat, N., Hellio, R., Debili, N., Weinstein, J., Bernheim, A., Vainchenker, W., *Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes*. *Blood*, 2001. **97**(8): p. 2238-47.

- 73 Mattia, G., Vulcano, F., Milazzo, L., Barca, A., Macioce, G., Giampaolo, A., Hassan, H.J., *Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release.* Blood, 2002. **99**(3): p. 888-97.
- 74 Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J.M., Jones, M.R., *Roads to polyploidy: the megakaryocyte example.* Journal of Cellular Physiology, 2002. **190**(1): p. 7-20.
- 75 Iancu-Rubin, C., Nasrallah, C.A., Atweh, G.F., *Stathmin prevents the transition from a normal to an endomitotic cell cycle during megakaryocytic differentiation.* Cell Cycle, 2005. **4**(12): p. 1774-82.
- 76 Zhang, Y., Nagata, Y., Yu, G., Nguyen, H.G., Jones, M.R., Toselli, P., Jackson, C.W., Tatsuka, M., Todokoro, K, Ravid, K., *Aberrant quantity and localization of Aurora-B/AIM-1 and survivin during megakaryocyte polyploidization and the consequences of Aurora-B/AIM-1-deregulated expression.* Blood, 2004. **103**(10): p. 3717-26.
- 77 Zhang, Y., Wang, Z., Ravid, K., *The cell cycle in polyploid megakaryocytes is associated with reduced activity of cyclin B1-dependent cdc2 kinase.* The Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(8): p. 4266-72.
- 78 Zhang, Y., Wang, Z., Liu, D.X., Pagano, M., Ravid, K., *Ubiquitin-dependent degradation of cyclin B is accelerated in polyploid megakaryocytes.* The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(3): p. 1387-92.
- 79 Datta, N.S., Williams, J.L., Long, M.W. *Differential modulation of G1-S-phase cyclin-dependent kinase 2/cyclin complexes occurs during the acquisition of a polyploid DNA content.* Cell Growth and Differentiation, 1998. **9**(8): p. 639-50.
- 80 Zimmet, J.M., Toselli, P., Ravid, K., *Cyclin D3 and megakaryocyte development: exploration of a transgenic phenotype.* Stem Cells, 1998. **16 Suppl 2**: p. 97-106.

- 81 Wang, Z., Zhang, Y., Kamen, D., Lees, E., Ravid, K., *Cyclin D3 is essential for megakaryocytopoiesis*. *Blood*, 1995. **86**: p. 3783-3788.
- 82 Zunino, R., Li Q., Rosé, S.D., Romero-Benítez, M.M., Lejen, T., Brandan, N.C., Trifaró, J.M., *Expression of scinderin in megakaryoblastic leukemia cells induces differentiation, maturation, and apoptosis with release of plateletlike particles and inhibits proliferation and tumorigenesis*. *Blood*, 2001. **98**(7): p. 2210-9.
- 83 Sanguinetti, A.R., H. Cao, and C. Corley Mastick, *Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1*. *The Biochemical Journal*, 2003. **376**(Pt 1): p. 159-68.
- 84 Lannutti, B.J., Shim, M.H., Blake, N., Reems, J.A., Drachman, J.G., *Identification and activation of Src family kinases in primary megakaryocytes*. *Experimental Hematology*, 2003. **31**(12): p. 1268-74.
- 85 Tong, W., Lodish, H.F., *Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2004. **200**(5): p. 569-80.
- 86 Guerriero, R., Parolini, I., Testa, U., Samoggia, P., Petrucci, E., Sargiacomo, M., Chelucci, C., Gabbianelli, M., Peschle, C., *Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes*. *Journal of Cell Science*, 2006. **119**(Pt 4): p. 744-52.
- 87 Cuneo, K.C., Geng, L., Tan, J., Brousal, J., Shinohara, E.T., Osusky, K., Fu, A., Shyr, Y., Wu, H., Hallahan, D.E., *SRC family kinase inhibitor SU6656 enhances antiangiogenic effect of irradiation*. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2006. **64**(4): p. 1197-203.
- 88 Giammona, L.M., Fuhrken, P.G., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M., *Nicotinamide (vitamin B3) increases the polyploidisation and proplatelet formation of cultured primary human megakaryocytes*. *British Journal of Haematology*, 2006. **135**(4): p. 554-66.

- 89 De Bruyn, C., Delforge, A., Martiat, P., Bron, D., *Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitor cells: cord blood versus mobilized peripheral blood*. Stem Cells and Development, 2005. **14**(4): p. 415-24.
- 90 Raslova, H., Baccini, V., Loussaief, L., Comba, B., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., *Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates both proliferation of megakaryocyte progenitors and late stages of megakaryocyte differentiation*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2303-10.
- 91 Lannutti, B.J., Blake, N., Gandhi, M.J., Reems, J.A., Drachman, J.G., *Induction of polyploidization in leukemic cell lines and primary bone marrow by Src kinase inhibitor SU6656*. Blood, 2005. **105**(10): p. 3875-8.
- 92 Vjestica, A., Tang, X.Z., Oliferenko, S., *The Actomyosin Ring Recruits Early Secretory Compartments to the Division Site in Fission Yeast*. Molecular Biology of the Cell, 2008.
- 93 D'Avino, P.P., Savoian, M.S., Glover, D.M., *Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(Pt 8): p. 1549-58.
- 94 Field, S.J., Madson, N., Kerr, M.L., Galbraith, K.A., Kennedy, C.E., Tahiliani, M., Wilkins, A., Cantley, L.C., *PtdIns(4,5)P2 functions at the cleavage furrow during cytokinesis*. Current Biology, 2005. **15**(15): p. 1407-12.
- 95 Geddis, A.E. Kaushansky, K., *Megakaryocytes express functional Aurora-B kinase in endomitosis*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1017-24.
- 96 Zhang, Y., Nagata, Y., Yu, G., Nguyen, H.G., Jones, M.R., Toselli, P., Jackson, C.W., Tatsuka, M., Todokoro, K., Ravid, K., *Aberrant quantity and localization of Aurora-B/AIM-1 and survivin during megakaryocyte polyploidization and the consequences of Aurora-B/AIM-1-deregulated expression*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3717-26.

- 97 Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., Caroni, P., *GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism.* The Journal of Cell Biology, 2000. **149**(7): p. 1455-72.
- 98 Wehrle, R., Caroni, P., Sotelo, C., Dusart, I., *Role of GAP-43 in mediating the responsiveness of cerebellar and precerebellar neurons to axotomy.* European Journal of Neuroscience, 2001. **13**(5): p. 857-70.
- 99 Arni, S., Keilbaugh, S.A., Ostermeyer, A.G., Brown, D.A., *Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues.* The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(43): p. 28478-85.
- 100 Greaves, J. Chamberlain, L.H., *Palmitoylation-dependent protein sorting.* The Journal of Cell Biology, 2007. **176**(3): p. 249-54.
- 101 Resh, M.D., *Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins.* Biochimica and Biophysica Acta, 1999. **1451**(1): p. 1-16.
- 102 El-Husseini, A.E., Craven, S.E., Chetkovich, D.M., Firestein, B.L., Schnell, E., Aoki, C., Bredt, D.S., *Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering.* The Journal of Cell Biology, 2000. **148**(1): p. 159-72.
- 103 Bijlmakers, M.J. and M. Marsh, *The on-off story of protein palmitoylation.* Trends in Cell Biology, 2003. **13**(1): p. 32-42.
- 104 Sirard, C., Laneuville, P., Dick, J.E., *Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism.* Blood, 1994. **83**(6): p. 1575-85.

- 105 Ritchie, A. Broxmeyer, H.E., *Suppression of p53-mediated growth factor withdrawal-induced apoptosis in the myeloid compartment by hematopoietic cytokines: an overview of hematopoiesis and apoptosis with a presentation of thrombopoietin and the M07E cell line as a model system.* Critical Reviews in Oncology and Hematology, 1999. **31**(3): p. 169-91.
- 106 O'Rourke, B., *Mitochondrial ion channels.* Annual Review of Physiology, 2007. **69**: p. 19-49.
- 107 Schembri, L., Dalibart, R., Tomasello, F., Legembre, P., Ichas, F., De Giorgi, F., *The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis.* Nature Methods, 2007. **4**(2): p. 107-8.
- 108 Jung, D., Côté, S., Drouin, M., Simard, C., Lemieux, R., *Inducible expression of Bcl-XL restricts apoptosis resistance to the antibody secretion phase in hybridoma cultures.* Biotechnology and Bioengineering, 2002. **79**(2): p. 180-7.
- 109 Ulrich, G., Ziessel, R., Harriman, A., *The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed.* Angewandte Chemie (International Edition in English), 2007.
- 110 Wang, L., Wang, Z.B., Zhang, X., FitzHarris, G., Baltz, J.M., Sun, Q.Y., Liu, X.J., *Brefeldin A disrupts asymmetric spindle positioning in mouse oocytes.* Developmental Biology, 2008. **313**(1): p. 155-66.
- 111 Dussault, N., Simard, C., Néron, S., Côté, S., *Human B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphoma cells become polyploid in response to the protein kinase inhibitor SU6656.* Blood Cells, Molecules and Diseases, 2007. **39**(1): p. 130-4.
- 112 Wennerberg, K., Der, C.J., *Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it).* Journal of Cell Science, 2004. **117**(Pt 8): p. 1301-12.

- 113 Cortin, V., Garnier, A., Pineault, N., Lemieux, R., Boyer, L., Proulx, C., *Efficient in vitro megakaryocyte maturation using cytokine cocktails optimized by statistical experimental design*. *Experimental Hematology*, 2005. **33**(10): p. 1182-91.
- 114 Pineault, N., Boucher, J.F., Cayer, M.P., Palmqvist, L., Boyer, L., Lemieux, R., Proulx, C., *Characterization of the effects and potential mechanisms leading to increased megakaryocytic differentiation under mild hyperthermia*. *Stem cells and development* 2008. June 3.
- 115 Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Mönch, K., Astrand-Grundström, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Jacobsen, S.E., *Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Scal(+)-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity*. *Immunity*, 2001. **15**(4): p. 659-69.
- 116 Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., Jacobsen, S.E., *Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment*. *Cell*, 2005. **121**(2): p. 295-306.
- 117 Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Witte, L., Hicklin, D.J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F., Rafii, S., *Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis*. *Nature Medicine*, 2004. **10**(1): p. 64-71.
- 118 Edgar, B.A. Orr-Weaver, T.L., *Endoreplication cell cycles: more for less*. *Cell*, 2001. **105**(3): p. 297-306.
- 119 Quentmeier, H., Zaborski, M., Drexler, H.G., *Effects of thrombopoietin, interleukin-3 and the kinase inhibitor K252a on growth and polyploidization of the megakaryocytic cell line M-07e*. *Leukemia*, **12**(10): 1603-1611.

- 120 Mantel, C., Braun, S.E., (1999)., *p21(cip-1/waf-1) deficiency causes deformed nuclear architecture, centriole overduplication, polyploidy and relaxed microtubule damage checkpoints in human hematopoietic cells*. *Blood*. **93**(4) : 0390-1398.
- 121 Benz, R., *Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes*. *CRC Critical Reviews in biochemistry*, 1985;19(2):145-90.
- 122 Benz, R. *Biophysical properties of porin pores from mitochondrial outer membrane of eukaryotic cells* . *Experientia*, 1990 Feb 15;**46**(2):131-7.
- 123 Pike, L.J., *Lipid rafts : heterogeneity on the high seas*. *The Biochemical Journal*, 2004. **378**, 281-292.
- 124 Brown, D.A., London, E., *Functions of the lipid rafts in biological membranes*, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1998. 14111-136.
- 125 Putnam, MA., Moquin, A.E., Merrihew, M., Outcalt, C., Sorge, E., Caballero, A., Gondré-Lewis, T.A., Drake, J.R., *Lipid raft-independent B cell receptor-mediated antigen internalization and intracellular trafficking*. *Journal of Immunology*, 2003 Jan 15;**170**(2):905-12.
- 126 Harding, H., Ron, D., *Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes*, *Diabetes*. 2002. **51** : 455-461.
- 127 Haas, J., Park, E.C., Seed, B., *Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein*. *Current Biology*. 1996. **6** :315-324.
- 128 Agbulut, O., Huet, A., Niederländer, N., Puceat, M., Menasché, P., Coirault, C., *Green fluorescent protein impairs actin-myosin interactions by binding to the actin-binding site of myosin*, *The Journal of Biological Chemistry*. 2007. **282**(14):10465-71.
- 129 Natakate, M., Kakiuchi, Y., Sasaki, N., Murakami-Murofushi, K., Yamada, O., *STAT3 and PKC differentially regulate telomerase activity during megakaryocytic differentiation of K562 cells*. *Cell Cycle* 2007 Jun 15;**6**(12):1496-501.

- 130 Emoto, K., Inadome, H., Kanaho, Y., Narumiya, S., Umeda, M., *Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis*, The Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(45) : 37901-37907.
- 131 Caroni, P., *New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts*. The Embo Journal, 2001. **20**(16): p. 4332-6.
- 132 Glotzer, M., *The mechanism and control of cytokinesis*. Current opinion in Cell Biology, 1997, **9** :815-823.
- 133 Umen, J.G., *The elusive sizer*. Current opinion in Cell Biology, 2005, **17** :435-441.
- 134 Strange, K. *Cellular volume homeostasis*. Advances in Physiology Education, 2004. **28**155-159.
- 135 Bard, F., Mazelin, L., Péchoux-Longin, C., Malhotra, V., Jurdic, P., *Src regulates Golgi structure and KDEL receptor-dependent retrograde transport to the endoplasmic reticulum*, The Journal of Biological Chemistry, 2003 Nov 21;278(47):46601-6.
- 136 De Matteis, M.A., *The role of the phosphoinositides at the Golgi complex*, Biochimica and Biophysica Acta., 2005; **1744**(3):396-405.
- 137 Sütterlin, C., Hsu, P., *Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells* Cell., 2002, **109** :359-369.
- 138 Fontana, A., Gross, E., *Fragmentation of polypeptides by chemical methods*. Methods in Protein Chemistry : A Handbook. (A. Darbre, ed.) pp68-120. John Wils and Sons.